

ALFREDO DE GOUVEA

**CONTROLE EM CAMPO E PÓS-COLHEITA DE DOENÇAS E METABOLISMO DO
MORANGUEIRO APÓS TRATAMENTO COM *Saccharomyces cerevisiae***

CURITIBA
2007

ALFREDO DE GOUVEA

**CONTROLE EM CAMPO E PÓS-COLHEITA DE DOENÇAS E METABOLISMO DO
MORANGUEIRO APÓS TRATAMENTO COM *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

Co-orientadores:

Prof^a. Dra. Louise Larissa May De Mio

Prof. Dr. Cícero Deschamps

CURITIBA

2007

G719c Gouvea, Alfredo de

Controle em campo e pós-colheita de doenças e metabolismo do morangueiro após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* / Alfredo de Gouvea - Curitiba : [s.n.], 2007. xviii, 85f. : il, 30 cm

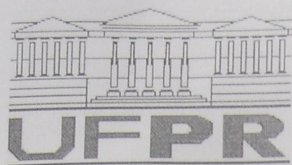
Orientador: Prof. Drº Luiz Antonio Biasi

Co-orientadores: Prof. Drª Louisse Larissa May de Mio, Prof. Drº Cícero Deschamps.

Tese – Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal do Paraná - UFPR

1.Agronomia. 2.Produção Vegetal. 3. Morango – Doenças.

CDD: 634.75



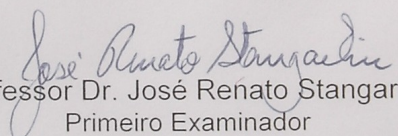
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

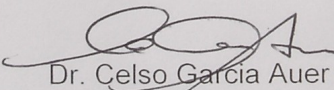
PARECER

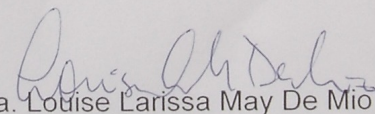
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pelo candidato **ALFREDO DE GOUVEA**, sob o título “**CONTROLE EM CAMPO E PÓS-COLHEITA DE DOENÇAS E METABOLISMO DO MORANGUEIRO APÓS TRATAMENTO COM *Saccharomyces cerevisiae***”, para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

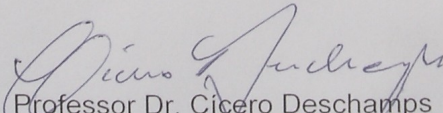
Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

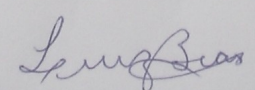
Curitiba, 11 de Dezembro de 2007.


Professor Dr. José Renato Stangarlin
Primeiro Examinador


Dr. Celso Garcia Auer
Segundo Examinador


Professora Dra. Louise Larissa May De Mío
Terceira Examinadora


Professor Dr. Cícero Deschamps
Quarto Examinador


Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Presidente da Banca e Orientador

DEDICO

A todo aquele que, na busca de um mundo melhor, pelo do respeito ao próximo, pela produção de alimentos de melhor qualidade, ler esta obra.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por tudo;

À minha esposa Carla e meus filhos Luiza e Luiz Alfredo pelo incentivo e compreensão;

Aos alunos da UTFPR Silvério Hennig, Fernando Gafuri, Jorge Paulo Ferreira, Mauro Sérgio Franzão, Lucas Vandersen, Márcio Piovesam, Ronei Roberto Portelles, Irineu Rosinek e os estagiários Técnicos Agrícolas Roberta Garbosa, Daiane Luckmann, Josinaldo Zanotti, Salatiel Turra e a todos que contribuíram na implantação e condução dos experimentos.

À empresa Improcrop do Brasil Ltda. pela doação do produto Agro-MOS® utilizado nos experimentos de campo.

À empresa Bioagro pela doação das mudas de morangueiro;

À empresa Beltrame Plásticos Ltda. pela doação dos materiais de consumo utilizados nos experimentos em campo.

À Maria Emília, laboratorista do Laboratório de Fitotecnia do SCA-UFPR, pela boa vontade e colaboração.

À professora Dra. Marisa de Cácia Oliveira pelo auxílio nas análises e ensinamentos.

À Vânia Cássia Fonseca pela preparação das diferentes formas de *Saccharomyces*, cujo empenho viabilizou este trabalho;

Ao Professor Dr. Auri Brackmann e a Cláudia Kaehler Sautter do Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita da UFSM, pelo auxílio e condução das análises experimentais;

Ao Professor Dr. Sérgio F. Pascholati da ESALQ-USP pela disponibilização de reagentes e do laboratório para realização de análises bioquímicas;

Ao meu irmão Odair José Kuhn da ESALQ-USP pela realização de análises bioquímicas e pelo apoio;

Guilherme Bertoldo pela hospedagem e ajudas nas análises;

Aos colegas Hernan Vielmo, Celso Eduardo Pereira Ramos e Almir Gnoatto pelo companheirismo no trajeto Dois Vizinhos-Curitiba.

Ao Genuíno Negri pelo entusiasmo e companheirismo.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Agronomia da UFPR.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia da UFPR.

Ao Sérgio Miguel Mazaro por compartilhar as alegrias e angústias do doutorado;

Ao Professor José Renato Stangarlin pelas contribuições.

Aos Professores Cícero Deschamps e Louise Larissa May De Mio pela orientação.

Ao Professor Luiz Antônio Biasi pela oportunidade e orientação.

BIOGRAFIA

Alfredo de Gouvêa nasceu na cidade de Ivaiporã no Estado do Paraná em 21 de janeiro de 1971.

Ingressou na Escola Agrotécnica Federal de São João Evangelista-MG em 1990, e em 1992 formou-se Técnico em Agropecuária.

Em 1993 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no curso de Licenciatura em Ciências Agrícolas, graduando-se em 1996. Neste período foi estagiário do CIMP - Centro Integrado de Manejo de Pragas "Cincinnato Rory Gonçalves", bolsista de pré-iniciação científica do CNPq de julho a dezembro de 1994 e de iniciação científica do CNPq de agosto de 1995 a julho de 1996, sob orientação do Professor Dr. Paulo César Rodrigues Cassino.

Tornou-se Especialista em Administração Escolar em 1997 pela Universidade Castelo Branco no Rio de Janeiro.

Aprovado em concurso público, ingressou como professor na Escola Agrotécnica Federal de Santa Inês-BA, onde atuou de junho de 1997 a julho de 1998.

Em agosto de 1998 iniciou suas atividades na Escola Agrotécnica Federal de Rio do Sul-SC, UNED de Dois Vizinhos-PR, transformada em Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná e posteriormente em Universidade Tecnológica Federal do Paraná onde desenvolve atividade de ensino pesquisa e extensão.

Em março de 2001 foi aceito no Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Marechal Cândido Rondon, onde, sob orientação do Professor Dr. Luis Francisco Angeli Alves, obteve em 2003 o título de Mestre em Agronomia.

Em março de 2005 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, sob orientação do Professor Dr. Luiz Antonio Biasi.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE ANEXOS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A cultura do morangueiro	3
2.1.1 Doenças do morangueiro	4
2.1.1.1 Mancha-de-micosferela	5
2.1.1.2 Mancha-de-dendrofoma	5
2.1.1.3 Flor-preta	6
2.1.1.4 Mofo-cinzento	7
2.2 Controle alternativo de doenças em plantas	9
2.2.1 Controle biológico	10
2.2.1.1 Uso de levedura no controle de doenças em plantas	11
2.2.1.1.1 Mecanismos de interação antagônica	13
2.2.1.1.2 Utilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no controle de doenças em plantas	15
2.2.1.1.2.1 Caracterização da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.2.1.1.2.2 Atuações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no controle biológico de doenças em plantas	18
2.3 REFERÊNCIAS	24
3 CAPÍTULO I - CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES E DE FLORES E METABOLISMO DO MORANGUEIRO APÓS TRATAMENTO COM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
RESUMO	
ABSTRACT	
3.1 INTRODUÇÃO	41
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	42

3.2.1	EXPERIMENTO 1- Avaliação de manchas foliares e flor-preta	42
3.2.1.1	Delineamento experimental e Implantação do experimento	42
3.2.1.2	Obtenção dos tratamentos	43
3.2.1.3	Avaliação das doenças	44
3.2.1.4	Avaliação da produtividade e crescimento foliar	46
3.2.2	EXPERIMENTO 2 - Avaliação bioquímicas	46
3.2.2.1	Delineamento experimental	46
3.2.2.2	Análises bioquímicas	47
3.2.2.3	Análise estatística	49
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.3.1	Efeito contra a mancha-de-micosferela	49
3.3.2	Efeito contra a mancha-de-dendrofoma	53
3.3.3	Efeito contra a flor-preta	54
3.3.4	Efeito sobre o crescimento e a produtividade	56
3.3.5	Alterações bioquímicas	58
3.4	CONCLUSÕES	63
3.5	REFERÊNCIAS	63
4	CAPÍTULO II - QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE MORANGO TRATADO EM PRÉ-COLHEITA COM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
	RESUMO	
	ABSTRACT	
4.1	INTRODUÇÃO	69
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	71
4.2.1	Delineamento experimental	71
4.2.2	Obtenção dos tratamentos	72
4.2.3	Avaliação da incidência de mofo-cinzento	72
4.2.4	Avaliação físico-química em pós-colheita	72
4.2.5	Avaliações fisiológicas	73
4.2.6	Análise estatística	74
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.3.1	Efeito contra o mofo-cinzento e alterações físico-químicas	74
4.3.2	Modo de ação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
4.4	CONCLUSÕES	79
4.5	REFERÊNCIAS	80
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

LISTA DE TABELAS

	página
TABELA 1 Número de lesões de mancha-de-micosferela (<i>Mycosphaerella fragariae</i>) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.....	50
TABELA 2 Incidência da mancha-de-micosferela (<i>Mycosphaerella fragariae</i>) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.	51
TABELA 3 Severidade da mancha-de-micosferela (<i>Mycosphaerella fragariae</i>) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.	51
TABELA 4 Diâmetro da lesão e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da incidência e da severidade de mancha-de-micosferela (<i>Mycosphaerella fragariae</i>) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.	52
TABELA 5 Incidência e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da incidência de mancha-de-dendrofoma (<i>Dendrophoma obscurans</i>) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.	53
TABELA 6 Incidência de antracnose (<i>Colletotrichum acutatum</i>) em flores e frutos de morango, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e número médio de frutos colhidos na época da avaliação, Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.	55
TABELA 7 Produtividade de morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.	57
TABELA 8 Concentração de proteínas solúveis em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa após o tratamento com diferentes	

	formas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2005.	59
TABELA 9	Concentração de açúcares totais em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa, após o tratamento com diferentes formas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2005.	60
TABELA 10	Concentração de açúcares redutores em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa, após o tratamento com diferentes formas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2005.	61
TABELA 11	Atividade de quitinases em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa, após o tratamento com diferentes formas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2005.	61
TABELA 12	Atividade de glucanases em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa, após o tratamento com diferentes formas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2005.	62
TABELA 13	Incidência de mofo-cinzento causado por <i>Botrytis cinerea</i> em frutos de morango, cultivar Camarosa, tratado em pré-colheita com diferentes formas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem inoculação, inoculado com <i>B. cinerea</i> e feridos artificialmente em pós-colheita, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.	75
TABELA 14	Parâmetros pós-colheita de frutos de morango, cultivar Camarosa, tratado em pré-colheita com diferentes formas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.	76

LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1 Sintomas da mancha-de-micosferela <i>Mycosphaerella fragariae</i> (A e B), mancha-de-dendrofoma (<i>Dendrophoma obscurans</i>) (C e D), antracnose (<i>Colletotrichum acutatum</i>) (E e F) e mofo-cinzeno causado por (<i>Botrytis cinerea</i>) (G e H).	8
FIGURA 2 Umidade relativa do ar e temperatura em Dois Vizinhos, médias dos valores diários dos períodos entre avaliações de doenças foliares, Paraná, Brasil, 2004.	54
FIGURA 3 Número de folhas por planta de morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.	57

LISTA DE QUADROS

	página
QUADRO 1 Cronograma das atividades desenvolvidas visando quantificar a mancha-de-micosferela (<i>Mycosphaerella fragariae</i>) em morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.	44
QUADRO 2 Cronograma das atividades desenvolvidas visando quantificar a mancha-de-dendrofoma (<i>Dendrophoma obscurans</i>) em morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.	45
QUADRO 3 Cronograma das atividades desenvolvidas visando quantificar a flor-preta (<i>Colletotrichum acutatum</i>) em morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.	46
QUADRO 4 Cronograma das atividades desenvolvidas visando avaliar o metabolismo de morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2005.	48
QUADRO 5 Cronograma das atividades desenvolvidas visando avaliar os parâmetros pós-colheita acidez titulável, firmeza de polpa, sólidos solúveis totais, síntese de etileno, respiração e incidência de mofo-cinzento (<i>Botrytis cinerea</i>) em frutos de morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento em pré-colheita com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença

SST – Sólidos Solúveis Totais

LISTA DE ANEXOS

	página
ANEXO I Resultado da análise química do solo da área do experimento para avaliação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para controle e indução de resistência a doenças em morangueiro, Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.	85

CONTROLE EM CAMPO E PÓS-COLHEITA DE DOENÇAS E METABOLISMO DO MORANGUEIRO APÓS TRATAMENTO COM *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

O morangueiro está sujeito ao ataque de várias doenças, que afetam o funcionamento de diversas partes da planta, sobretudo a área foliar, flores e frutos, reduzindo a produtividade. Além da redução na produtividade da cultura, as doenças continuam provocando prejuízos no período pós-colheita, reduzindo a vida de prateleira dos frutos, limitando a comercialização, sobretudo à longas distâncias. O controle destas doenças é feito com o uso intensivo de agrotóxicos, que elevam o custo de produção, têm sua eficiência comprometida pelo surgimento de populações de patógenos resistentes a produtos e podem deixar resíduos nocivos no ambiente e nos frutos. Produtores e pesquisadores têm buscado opções para substituir o uso de agrotóxicos e têm encontrado alternativas promissoras no controle biológico e na indução de resistência às doenças. Dentre os agentes avaliados em diferentes culturas nestas modalidades de controle, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem apresentado bons resultados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes preparações de *S. cerevisiae* sobre o desenvolvimento das seguintes doenças do morangueiro: mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau (1897)), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans* (Ellis & Everh.) H.W. Anderson (1920)), flor-preta (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds (1965)) e mofo-cinzento (*Botrytis cinerea* Pers. (1794)), durante o desenvolvimento da cultura e em pós-colheita dos frutos, bem como avaliar o mecanismo de ação da levedura no sistema patógeno-hospedeiro. O trabalho foi realizado na UTFPR-Campus Dois Vizinhos em 2004 e 2005 com experimentos em delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições, utilizando-se 16 plantas da cultivar Camarosa por parcela, cultivada em sistema de túnel baixo e irrigação localizada. Os tratamentos consistiram na pulverização semanal de cinco diferentes preparados a partir da levedura *S. cerevisiae*, suspensão com fermento biológico fresco comercial, suspensão de células de levedura, filtrado de cultura em meio líquido e Agro-MOS®, um produto comercial formulado a partir da levedura, além da testemunha com água destilada e do tratamento controle com aplicação de combinações de fungicidas. Foram avaliadas a incidência e ou severidade das doenças no campo e em pós-colheita e compostos bioquímicos de folhas e frutos. Nenhuma das preparações apresentou efeito duradouro contra a mancha-de-micosferela; preparações com presença de células vivas e o produto Agro-MOS® apresentaram efeito contra mancha-

de-dendrofoma; preparações com suspensão do produto comercial e filtrado de cultura líquida reduziram a incidência de flor-preta em flores e frutos; à exceção do tratamento com suspensão autoclavada de células, as demais preparações (suspensão de células, suspensão com produto comercial, filtrado de cultura líquida e Agro-MOS®) reduziram a incidência de mofo-cinza em pós-colheita de frutos; e preparações de *S. cerevisiae* com suspensão de células e filtrado de cultura líquida promoveram aumento na produtividade dos morangueiros. As preparações de *S. cerevisiae*, com presença de células vivas ou não, alteraram o metabolismo do morangueiro, aumentando a atividade de enzimas envolvidas na resistência sistêmica adquirida quitinases e glucanases. Os resultados indicam que *S. cerevisiae* é um potencial agente de biocontrole, devendo ser conduzidos outros estudos com a levedura, inclusive em associação com outras alternativas, no controle de doenças no morangueiro.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa*, *Mycosphaerella fragariae*, *Dendrophoma obscurans*, *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea*

CONTROL IN FIELD AND POST-HARVEST OF DISEASES AND METABOLISM OF STRAWBERRY PLANTS AFTER TREATMENT WITH *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The strawberry plant is subject to the attack of many diseases that affect the functioning of diverse parts of the plant, over all the leaf, flowers and fruits reducing the productivity. Beyond the reduction in the harvest caused in the field, the diseases continue provoking damages in the post-harvest period, reducing the lifetime of the fruits, limiting the commercialization, above all, at long distances. The control of these diseases is made with the intensive use of fungicides that raise the production cost, have its efficiency compromised by the sprouting of populations of resistant pathogens to the products and can leave harmful residues in the environment and fruits. Producers and researchers have searched options to substitute the use of fungicides and have found promising alternatives in the biological control and induction of resistance to the diseases. Amongst the agents evaluated in these modalities of controlling, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has presented good results. The present work had the objective of evaluating the effect of different preparations of the *S. cerevisiae* over the development of diseases in the strawberry plant, as well as evaluating the mechanism of action the yeast has in the pathogen-host system. This work was carried out in 2004 and 2005 at Federal University of Technology - Parana, *Campus* Dois Vizinhos - PR. The experimental design used was a randomized block with four replications containing 16 plants each. The treatments consisted of a weekly spraying of five different preparations of the yeast *S. cerevisiae*, suspension of the commercial fresh biological yeast available, suspension of the yeast cells, suspension of the autoclaved cells, filtered of culture in liquid medium and Agro-MOS® and a control with water spraying and another control with fungicides. None of the preparations presented effective and lasting effect against the mycosphaerella leaf spot (*Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau (1897)); preparations with presence of alive cells and the product Agro-MOS® presented effect against leaf blight (*Dendrophoma obscurans* (Ellis & Everh.)) H.W. Anderson (1920); preparations with suspension of commercial product and filtered of liquid culture reduced the incidence of anthracnose in flowers and fruits (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds (1965)); except for the treatment with suspension of autoclaved cells, the other preparations, suspension of cells, suspension with commercial product, filtered of liquid culture and Agro-MOS® reduced the incidence of gray mould (*Botrytis cinerea* Pers. (1794)) in the post-harvest of fruits; preparations of *S. cerevisiae* with suspension of cells,

suspension of autoclaved cells e filtered of liquid culture promoted increase in the productivity of the strawberry plants; and the preparations of *S. cerevisiae*, with the presence of alive cells or not, modified the metabolism of the strawberry plant, increasing the activity of enzymes involved in the acquired systemic resistance chitinases and β -1,3-glucanases. The results indicate that *S. cerevisiae* is a potential agent for biocontrol of diseases. Further studies have to be lead with the yeast, including the association with other alternatives to control the diseases in strawberry plants.

Key words: *Fragaria x ananassa*, *Mycosphaerella fragariae*, *Dendrophoma obscurans*, *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea*

1. INTRODUÇÃO

As frutas são importantes na dieta humana porque fornecem nutrientes essenciais tais como vitaminas, minerais e outros compostos importantes como os antioxidantes. O consumo de frutas vem aumentando em consequência da maior consciência do consumidor de que a dieta alimentar e a saúde estão ligadas. Entre as frutas, o morango tem sido cada vez mais consumido pelo seu sabor, além de ser uma excelente fonte de vitamina C, folato, potássio e bioflavonóides anticancerígenos, além de possuir poucas calorias e muitas fibras (SPADARO, 2003; ABH, 2007).

O seu cultivo desempenha um importante papel socioeconômico, pois é desenvolvido em pequenas propriedades e com necessidade de mão-de-obra em todo seu ciclo, gerando emprego e renda. Entretanto, com o crescimento da área plantada com o morangueiro, intensificam-se os problemas fitossanitários na cultura (REICHERT & MADAIL, 2003).

Um dos problemas atuais de maior gravidade é a alta incidência de doenças, reduzindo a produtividade e causando entraves na fase da comercialização, sobretudo a grandes distâncias, pela alta perecibilidade dos frutos. O morango é considerado uma fruta não climatérica, sendo de difícil conservação devido à sua rápida degradação pela intensa atividade metabólica e grande suscetibilidade ao ataque de patógenos (BRACKMANN et al., 1999; BRACKMANN et al., 2001, ZHANG et al., 2007a).

A forma predominante de controle das doenças é com o uso intensivo de agrotóxicos, o que tem levado a graves problemas, como o surgimento de populações de patógenos resistentes a fungicidas, o aumento do custo de produção, a contaminação ambiental e a resistência ao consumo do fruto ocasionadas pelo uso em larga escala de agrotóxicos. O aumento no consumo de frutas é acompanhado da conscientização por parte dos consumidores sobre a necessidade de ingerirem alimentos livre dos resíduos de pesticidas, toxinas e microrganismos prejudiciais (TANAKA et al., 1997; HELBIG, 2001; FERNANDES JUNIOR et al., 2002; SPADARO et al., 2002).

Diante da necessidade de minimizar esses problemas, produtores e pesquisadores buscam formas alternativas de manejo fitossanitário. Dentre as diversas estratégias destacam-se o controle biológico e a indução de resistência às doenças de plantas. Em ambas as alternativas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (1838) é apontada por diversos autores como tendo um grande potencial de utilização (LOPES, 2001; CARDOSO FILHO, 2003; DANTAS et al., 2004; FIALHO, 2004; CIA, 2005; BONALDO, 2005; PICCININ et al., 2005).

A levedura tem sido estudada na proteção de plantas de diversas espécies vegetais atuando por diferentes mecanismos. *S. cerevisiae* pode induzir resistência em plantas contra doenças. A levedura pode atuar diretamente sobre o patógeno por antibiose ou competição, tendo sido encontrados resultados positivos no controle de doenças e no aumento da produtividade (LOPES, 2001; CARDOSO FILHO, 2003; DANTAS et al., 2004; FIALHO, 2004; CIA, 2005; BONALDO, 2005; PICCININ et al., 2005).

Apesar da crescente demanda da sociedade por alimentos de melhor qualidade, livres de resíduos de agrotóxicos e com menores impactos sobre os recursos naturais, ainda é inexpressivo o uso de agentes de controle biológico de doenças de plantas, com poucos produtos comerciais e apenas parte deles devidamente registrados. Assim, faz-se necessária a intensificação de trabalhos de pesquisa direcionados às diversas etapas para obtenção de produtos para biocontrole, tais como, avaliações dos mecanismos de ação envolvidos nas interações entre os agentes de biocontrole e os patógenos, as plantas e o meio ambiente (MORANDI et al., 2005; BATTA, 2007).

Diante dos resultados positivos obtidos na proteção de plantas contra patógenos em laboratório e em pós-colheita por *S. cerevisiae* e da inexistência de informação sobre o efeito da levedura sobre as doenças do morangueiro em condições de cultivo e em pós-colheita, experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito de diferentes preparados a partir de *S. cerevisiae* sobre o desenvolvimento de doenças do morangueiro, frutos colhidos e o mecanismo de ação da levedura no sistema patógeno-hospedeiro, bem como relacionar o resultados dos tratamentos com a produtividade.

O presente trabalho é composto de três partes, sendo que na primeira são apresentados os resultados dos estudos realizados para avaliar o uso de *S. cerevisiae* no controle de doenças em plantas. Na segunda parte são relatados os experimentos realizados, em 2004, para avaliar o efeito de *S. cerevisiae* sobre doenças foliares e de flores e em 2005, para avaliar o efeito da levedura sobre o metabolismo do morangueiro. Na terceira parte é abordado o efeito de *S. cerevisiae* aplicado em pré-colheita em morangueiro sobre a qualidade pós-colheita dos frutos em experimentos realizados em 2004.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do morangueiro

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertence à família das Rosaceas, sendo um híbrido resultante das espécies americanas *Fragaria chiloensis*, *Fragaria virginiana* e *Fragaria ovalis*, e da européia *Fragaria vesca* (RADMANN et al., 2006). O morango é uma fruta apreciada no mundo inteiro pelas qualidades nutritivas e sabor atraente, consumida *in natura*, ou por múltiplas maneiras de processamento industrial. Os Estados Unidos é o maior produtor mundial, com cerca de 750 mil toneladas, detendo também a maior produtividade. Países como Espanha, Japão, Polônia e Itália compõem o rol dos maiores produtores mundiais (REICHERT & MADIAL, 2003).

No Brasil, a cultura do morango vem sendo desenvolvida desde o final do século XVIII em jardins e hortas caseiras. A partir de meados do século XIX, a cultura passou a ganhar importância econômica nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. A partir dos anos 60, graças aos trabalhos de melhoramento genético desenvolvido no Rio Grande do Sul, pela Estação Experimental de Pelotas, pertencente ao Ministério da Agricultura, e pelo Instituto Agrônomo de Campinas, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, surgiram as primeiras cultivares nacionais, adaptadas, produtivas e com frutos de qualidade, dando à atividade um grande impulso (CONTI et al., 2002; SANTOS & MEDEIROS, 2003; RADMANN et al., 2006).

Atualmente o morango é, entre as pequenas frutas, a que tem maior área cultivada e que está melhor adaptada, encontrando-se em regiões de clima temperado a subtropical. A produção brasileira está estimada em 90 mil toneladas por ano, sendo plantada em uma área aproximada de 3.600 ha. O cultivo está concentrado nos estados de Minas Gerais (41,4%), Rio Grande do Sul (25,6%), São Paulo (15,4%), Paraná (4,7%) e Distrito Federal (4%). Normalmente, é plantado em áreas de 0,5 a 1,0 ha, gerando empregos para três pessoas/ha/ano, com faturamento de R\$ 26.000,00 por hectare. Trata-se de uma importante atividade econômica, principalmente em pequenas propriedades rurais que utilizam mão-de-obra familiar (RIGON et al., 2005 ; RADMANN et al., 2006; DIAS et al., 2007b).

No Paraná, quarto maior produtor nacional, a produção se concentra no Norte Pioneiro com destaque para o município de Pinhalão que possui a maior área plantada e produção. A região de Curitiba é a segunda maior produtora, seguida por Toledo. Recentemente a produção de morango tem se expandido para a Região de Londrina e

Norte do Estado, com boas perspectivas para exploração comercial (REICHERT & MADIAL, 2003).

As cultivares de morango se encontram divididas em dois grupos segundo as finalidades de indústria ou para consumo *in natura*. As principais cultivares plantadas no Brasil com destino à indústria são Santa Clara, Burlkey, Dover e, para consumo, *in natura* Tangi, Campinas, Osogrande, Tudla, Selva e Seascape e, para dupla finalidade, Camarosa e Vila Nova. Camarosa é uma cultivar de dias curtos, ciclo precoce e com alta capacidade de produção. As plantas são vigorosas, com folhas grandes e coloração verde escura. Os frutos são de tamanho grande, com epiderme vermelha escura e polpa de textura firme e de coloração interna vermelha brilhante, escura e uniforme. Possuem sabor subácido, próprio para consumo *in natura* e industrialização. A cultivar, no entanto, é suscetível à mancha-demicosferela (*Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau (1897)), à antracnose (*Colletotrichum fragariae* A.N. Brooks (1931) e *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds (1965)) e ao mofo-cinzeno (*Botrytis cinerea* Pers. (1794)) (SANTOS, 2007).

2.1.1 Doenças do morangueiro

O morangueiro é suscetível à várias doenças e a maioria delas causados por fungos. Várias destas doenças ocorrem a campo reduzindo a produtividade, outras são mais importantes no período pós-colheita, depreciando o produto comercializado. No Brasil, o clima é extremamente favorável ao desenvolvimento da maioria dos patógenos, aliado ao cultivo intensivo e às práticas culturais inadequadas. O fato da propagação ser feita de forma vegetativa, torna as doenças um dos principais fatores responsáveis pelas perdas (CALVETE et al., 2002; FORTES, 2003; TANAKA et al., 2005; DIAS et al., 2007a).

O controle cultural é de extrema importância no manejo de doenças (SCHMID et al., 2005), no entanto, em geral estas são controladas por aplicações frequentes de agrotóxicos, que apresentam os inconvenientes de onerar o custo de produção, de existirem poucas opções de produtos registrados para a cultura, da ineficácia de muitos princípios ativos diante do surgimento de populações resistentes e da necessidade de atenção especial com a toxicidade e da observância do período de carência, uma vez que o morango é largamente consumido *in natura* e colhido diariamente (TANAKA, 2002).

2.1.1.1 Mancha-de-micosferela

A mancha-de-micosferela, causada pelo fungo *M. fragariae*, um Ascomiceto, cuja forma assexual corresponde a *Ramularia tulasnei* Sacc. (1886), é uma das mais importantes e freqüentes doenças foliares do morangueiro nas condições brasileiras de cultivo. A manifestação de sintomas foi observada em 100% dos 23 genótipos de morangueiro inoculados com o patógeno em um teste de suscetibilidade à *M. fragariae* realizado por DELHOMEZ et al. (1995) e, de acordo com RABELO & BALARDIN (1997), nenhuma cultivar de morangueiro apresenta resistência às raças fisiológicas conhecidas do patógeno. Dependendo da suscetibilidade da cultivar e das condições climáticas observa-se intensa redução da área fotossintética e sérios prejuízos à qualidade de frutos, com danos na produção da ordem de 10 a 100% (DALE & FULTON 1957¹ apud TANAKA, 2002; TANAKA et al., 2005).

A doença se expressa inicialmente através de pequenas manchas foliares arredondadas de coloração púrpura escura e com contornos definidos (Figura 1 A e B). Com o crescimento das lesões formam-se manchas circulares de 3 a 5 mm de diâmetro, centro necrosado, variando do marrom claro ao branco, circundadas por um halo vermelho-púrpura. Essas lesões podem coalescer e atingir toda área foliar, culminando com a seca da folha. Os sintomas também podem se manifestar em pecíolos, estolhos, cálices e frutos, porém a sua ocorrência é rara. A doença é favorecida por períodos de alta umidade e temperaturas na faixa de 20 a 25 °C (TANAKA, 2002).

A forma perfeita do fungo produz peritécios escuros globosos, parcialmente imersos, medindo 100-150 µm de diâmetro e são providos de pequeno ostíolo. As ascas são cilíndricas e clavadas, com 30-40 µm por 10-15 µm e contêm ascosporos hialinos e bicelulares medindo 12-15 µm por 3-4 µm. *R. tulasnei* forma conídios elípticos a cilíndricos, de 20-40 µm por 3-5 µm, hialinos, podendo ser asseptados ou até conter quatro septos. O fungo dissemina-se predominantemente na forma assexual em função da produção abundante de conídios sobre as lesões, que são carregados pelo vento ou pela água da chuva ou irrigação (TANAKA, 2002).

2.1.1.2 Mancha-de-dendrofoma

A mancha-de-dendrofoma, causada por *Dendrophoma obscurans* (Ellis & Everh.) H.W. Anderson (1920), sin. *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh.) B. Sutton (1965) é uma

1 DALE, J. L.; J.P. FULTON. Severe loss from strawberry leaf spot in Arkansas in 1957. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v.41, n.8, p. 681-682, 1957.

doença que apresenta pouca importância em nossas condições de cultivo, afetando principalmente as folhas velhas no final do ciclo, sendo favorecida por alta umidade e temperaturas elevadas. Nos folíolos observam-se inicialmente manchas vermelho-púrpuras, que com o tempo, evoluem a necróticas, circulares, centro marrom-escuro circundado por zona marrom-claro. Lesões mais velhas podem apresentar formato elíptico ou em "V" (Figura 1 C e D) (ESHENAUER & MILHOLLAND, 1989; NITA et al., 2003; TANAKA et al., 2005).

D. obscurans forma picnídios negros, imersos e globosos. Os conídios são hialinos, unicelulares e elípticos e, quando liberados, ficam aderidos aos ostíolos, sendo dispersos pelo impacto de gotas de água. O fungo sobrevive de um ano para outro como micélio ou picnídios presentes nas folhas que permanecem no local, servindo de inóculo primário (TANAKA, 2002).

2.1.1.3 Flor-preta

Colletotrichum acutatum pode causar doenças em pré e pós-colheita no mundo inteiro sobre uma larga escala de culturas economicamente importantes, tais como a amêndoa, maçã, abacate, mirtilo, citros, cranberries (uva do monte), uva, kiwi, mamão, pêssogo, pecan, pimenta, morango e tomate (GUERBER et al., 2003).

No morangueiro, *C. acutatum* causa a flor-preta, uma das mais importantes e destrutivas doenças da cultura no mundo. A existência de raças fisiológicas, resistência vertical e horizontal e a grande variabilidade genética do patógeno dificulta a obtenção de cultivares resistentes (LEANDRO et al., 2001; DOMINGUES et al., 2001; TANAKA & PASSOS, 2002; TANAKA et al., 2005). Em nossas condições de cultivo a doença pode causar danos que variam entre 30 e 68 % (HENZ et al., 1992).

C. acutatum é um fungo mitospórico cuja fase sexuada corresponde a *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk (1903). Os conídios são formados em acérvulos quase sempre desprovidos de setas, ou com setas esparsas, muitas vezes encobertas por massa conidial gelatinosa (TANAKA, 2002).

Os sintomas são geralmente observados nas inflorescências, mas o fungo pode infectar os frutos, pedúnculos, limbo foliares e meristemas apicais. Frequentemente a infecção tem início nos pedúnculos, formando lesões alongadas e escuras, atingindo em seguida os cálices, as flores e os frutos, que em infecções severas podem ficar com aspecto queimada devido a necrose e mumificação (Figura 1 E e F). Nos frutos já desenvolvidos as lesões são arredondadas, aprofundadas, firmes e podem ser escuras ou marrom claro,

tornando-se alaranjadas no centro quando ocorre a produção de esporos (TANAKA, 2002; LEANDRO et al., 2003; FREEMAN et al., 2004).

O fungo é favorecido por temperaturas em torno de 25 a 30 °C e alta umidade. O patógeno possui vários hospedeiros alternativos e sobrevive até nove meses em restos culturais enterrados que são importantes fontes de inóculo. A disseminação da doença nos canteiros ocorre principalmente pelos respingos da água da chuva e irrigação. Em áreas novas, as mudas com infecção latente ou lesões com mancha-irregular-da-folha, cujos sintomas geralmente passam despercebidos, são a principal via de introdução do patógeno (MADDEN & BOUDREAU, 1997; TANAKA et al., 1997; TANAKA et al., 2005).

2.1.1.4 Mofo-cinzento

O mofo-cinzento (*B. cinerea*) representa uma importante e freqüente doença do morangueiro no mundo (BOFF et al., 2003; SCHMID et al., 2005; SANSONE et al., 2005) atacando também várias outras espécies de importância econômica. Sob condições de alta umidade e temperaturas amenas as perdas pela doença no campo podem exceder 50% (BLANCO et al., 2006). A doença também reduz a vida pós-colheita dos frutos, sendo que os danos por podridões podem chegar a níveis de 20 a 40% em poucos dias (BRACKMANN et al., 2001), tornando-se um dos maiores entraves da cultura por limitar a comercialização, sobretudo à grandes distâncias (BRACKMANN et al., 1999).

O mofo-cinzento é causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, estágio conidial do Ascomiceto *Botryotinia fukeliana* (De Bary). Os conídios unicelulares, medindo 11 por 11 a 15 µm, são abundantemente produzidos em colônias acinzentadas sobre frutos ou em meio de cultura (Figura 1 G e H). A infecção geralmente inicia-se em tecido debilitado, especialmente pétalas senescentes, para posteriormente infectar os tecidos saudáveis do fruto. A doença pode destruir botões florais e frutos verdes, no entanto, na maioria das vezes, as infecções permanecem latentes e os sintomas se manifestam somente no início do amadurecimento dos frutos (HELBIG, 2001). Em frutos verdes, os sintomas são caracterizados pela presença de pequenas lesões marrons levemente depressivas. Em frutos maduros, essas lesões tornam-se recobertas por um crescimento acinzentado constituído por estruturas do patógeno, que rapidamente tomam toda superfície do fruto. Com a evolução dos sintomas, os frutos podem apodrecer completamente ou ainda tornar-se mumificados. O fungo pode sobreviver em restos de culturas e a disseminação da doença ocorre principalmente pela ação do vento, água da chuva e irrigação, bem como durante o processo da colheita (TANAKA, 2002).

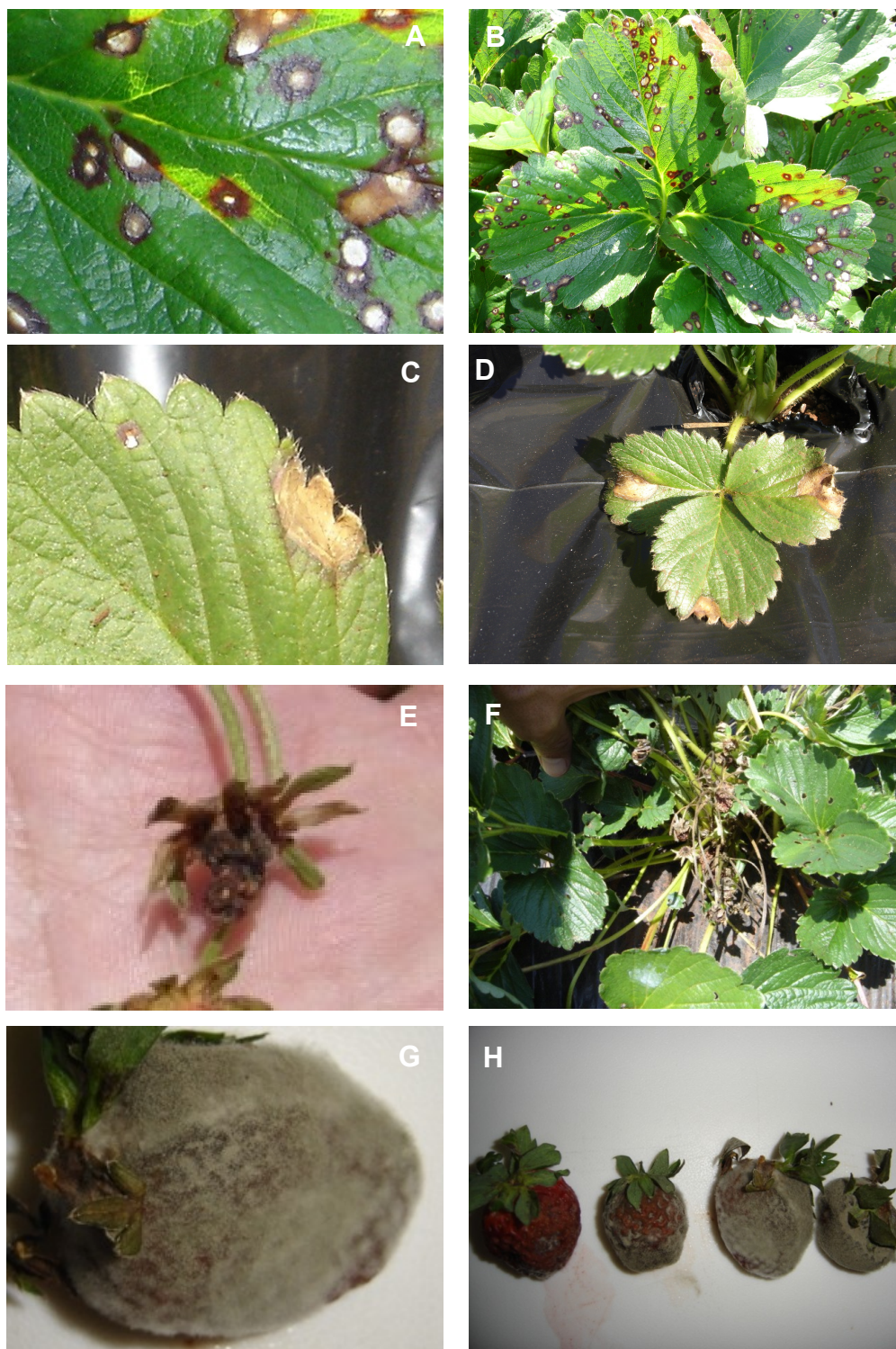


Figura 1- Sintomas da mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragaria*) (A e B), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) (C e D), flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) (E e F) e mofo-cinzento (*Botrytis cinerea*) (G e H).

2.2 Controle alternativo de doenças em plantas

O controle de doenças, pragas e plantas daninhas é um dos principais problemas da agricultura sustentável. Os agrotóxicos fazem partes do conjunto de tecnologias associadas ao processo de modernização da agricultura que ocorreu a partir da década de 60, com o objetivo de aumentar a produtividade na agricultura e para atender aos desafios da demanda crescente de alimentos. No entanto, com o uso generalizado dos agrotóxicos nas mais diferentes condições ambientais, muitos problemas começaram a ser percebidos e diagnosticados, tais como a ocorrência de patógenos, pragas e plantas daninhas resistentes a produtos. Esta situação é agravada pelo longo tempo e os altos custos envolvidos no processo de desenvolvimento de novos compostos para substituir aqueles com problema de resistência (CALVENTE et al., 1999; GERHARDSON, 2002; DUFFY et al., 2003; BETTIOL & GHINI, 2003; CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003; SANSONE et al., 2005).

Outros graves problemas decorrentes do controle químico foram observados, como o efeito indesejável sobre organismos não alvo, levando ao desequilíbrio do agroecossistema, o surgimento de doenças iatrogênicas e a possibilidade de alguns destes produtos químicos causarem câncer e mutações genéticas em descendentes (LIMA et al., 1997; HEYDARI & MISAGHI, 1998; LIMA et al., 1999; LIMA et al., 2000; BATTA, 2007).

A crescente conscientização sobre o risco do uso de agrotóxicos tem levado a reações da sociedade resultando em avanços na legislação de registro e uso desses produtos químicos, o estabelecimento de políticas públicas visando a redução de uso de tais produtos e a valorização de alimentos produzidos sem a aplicação dos mesmos, o que tem levado agricultores e pesquisadores a buscar formas alternativas de controle (HEYDARI & MISAGHI, 1998; CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003; FIALHO, 2004).

O controle alternativo de doenças inclui as medidas que não englobam o controle químico clássico e o melhoramento genético de plantas para resistência às doenças. Diversas alternativas vêm se mostrando promissoras envolvendo o uso de microrganismos antagonistas, fungicidas naturais e a indução de resistência em plantas (DROBY et al., 1998; PASCHOLATI, 1998). Recentes pesquisas em torno da eficiência, do modo de ação e formulação de agentes microbiológicos de controle, indicam que estes métodos podem ser economicamente vantajosos comparados com a aplicação dos pesticidas para controle de determinados problemas (CALVENTE et al., 1999; GERHARDSON, 2002; DUFFY et al., 2003; SANSONE et al., 2005).

De acordo com ROMEIRO (1999), há extrema necessidade de se investigar, com seriedade e persistência, métodos alternativos para o controle de enfermidades de plantas

que sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivos à saúde humana e ao equilíbrio de ecossistemas. Encontrar uma forma, o mais inócua possível, de ativar os mecanismos de defesa da planta deixando que ela própria se proteja contra patógenos, ao invés de saturá-la e intoxicá-la com defensivos, por certo será a estratégia politicamente correta do futuro.

O controle biológico com uso de antagonistas vem demonstrado ser uma das alternativas mais promissoras, sozinho ou como parte de uma política de manejo integrado de doenças para reduzir o uso de pesticidas. O controle biológico é uma alternativa não perigosa ao uso de fungicidas químicos, envolve o uso de processos biológico para reduzir a perda das culturas. A busca de agentes biológicos para a proteção de planta tem intensificado nos últimos anos e resultados de pesquisas realizadas no mundo inteiro demonstram que vários microrganismos (*Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Candida oleophila*, *Candida causa*, *Debaryomyces hansenii*, *Gliocladium* sp., *Trichoderma* sp., *Pichia guilliermondii*, *Pythium* spp., *Cryptococcus laurentii* e outros) são eficazes e promissores na proteção de plantas contra infecções fúngicas, bem como na proteção de frutos em pós-colheita (HELBIG, 2001; SANTOS & MARQUINA 2004; ZHANG et al., 2005; PAL & GARDENER, 2007; ZHANG, 2007b).

2.2.1. Controle biológico

Tradicionalmente, o controle biológico é definido como o controle de um microrganismo através de outro microrganismo, no entanto, em 1974, Baker & Cook propuseram uma definição de controle biológico de forma mais abrangente como sendo a redução da densidade de inóculo ou das atividades da doença provocada por um patógeno ou parasita no seu estado de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizada naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas. Em 1983, Cook & Baker propuseram que controle biológico é a redução da quantidade de inóculo ou da atividade de produção de doença de um patógeno utilizando de um ou mais organismos, exceto o homem (BAKER & COOK, 1974 e COOK & BAKER, 1983).

A habilidade dos microrganismos naturais de inibir o crescimento ou a atividade metabólica de microrganismos deletérios foi estudada intensivamente durante o século passado e continua a inspirar a pesquisa em muitos campos, incluindo a descoberta de medicamentos e a proteção de culturas. O interesse no controle biológico dos patógenos da planta pela introdução de microrganismos antagonísticos em superfícies da planta, em flores e frutos ou no material propagativo aumentou mais na década passada. Este interesse está

aumentado, em parte, devido ao desejo de realçar a sustentabilidade da agricultura e também porque o biocontrole pode fornecer o controle das doenças de planta que não podem, ou podem parcialmente, ser controladas por outras estratégias (DUFFY et al., 2003).

Desde a primeira reunião científica sobre o biocontrole na década de 1960, a pesquisa e o desenvolvimento trouxeram mais de 80 produtos de biocontrole ao mercado comercial até 2001 (PAULITZ & BÉLANGER, 2001).

Embora o número de produtos de biocontrole esteja aumentando, estes produtos representam ainda aproximadamente 1% de vendas químicas agrícolas nos EUA. Os fungicidas representam aproximadamente 15% das vendas dos pesticidas. Não obstante, a resistência do patógeno aos fungicidas promoveu o interesse no desenvolvimento dos agentes do biocontrole e as contribuições dos biopesticidas são importantes porque oferecem modalidades diferentes da ação em relação aos pesticidas químicos e podem, conseqüentemente, ser aplicadas na rotação com pesticidas para reduzir o desenvolvimento possível da resistência no patógeno (FRAVEL, 2005).

Existe a possibilidade de, assim como no controle químico de doenças, as constantes pressões exercidas pelos agentes de controle biológico também resultar, de forma relativamente mais lenta, em mudanças no patógeno levando ao surgimento de populações resistentes. Em função disto, a grande diversidade de leveduras com atuação antagônica e sua multiplicidade de mecanismos de ação tornam estes organismos fortes candidatos a agentes de controle biológico (DUFFY et al., 2003).

2.2.1.1 Uso de levedura no controle de doenças em plantas

As leveduras e os fungos leveduriformes são os componentes principais da comunidade microbiana epifítica dos vegetais (ELMER & REGLINSKI, 2006; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006). Ocorrem naturalmente sobre ou no interior das folhas das plantas, raízes e outras estruturas, vivendo como epífitas ou saprófitas usando os nutrientes disponíveis (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

As leveduras são empregadas, com grande frequência, na obtenção de produtos de consumo diário, entre eles o pão e as bebidas alcoólicas, destacando-se as fermentadas e aquelas posteriormente destiladas. Caracterizam-se por apresentarem alta resistência às condições de ambiente, pH, presença de sais e temperatura de até, aproximadamente 35 °C, alta taxa de reprodução, podendo se reproduzir sexuadamente, formando esporos, ou por reprodução assexuada, envolvendo brotamento, gemulação ou fissão binária (BLUMER, 2002).

O uso de leveduras no controle de doenças teve início no fim dos anos 80 e começo dos anos 90, quando uma variedade de antagonistas microbianos foram relatados como agentes de controle de diversos patógenos em várias frutas. Os antagonistas foram apresentados como alternativa promissora ao controle das doenças pós-colheita com fungicida. Entre estes antagonistas muitos eram leveduras e organismos leveduriformes como *P. guilliermondii* e diversas espécies de *Cryptococcus* para o controle da podridão pós-colheita em maçãs e em pêras (DRUVEFORS, 2004).

As pesquisas visando elucidar o potencial destes organismos como agentes de controle biológico se intensificaram nos últimos anos, conduzindo ao desenvolvimento e registro de diversos agentes microbianos comerciais para o manejo de doenças (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

Diversas propriedades importantes das leveduras fazem-nas úteis para finalidades do biocontrole: por exemplo, as leveduras não produzem os esporos alergênicos ou micotoxinas tanto como os fungos filamentosos, ou metabólicos antibióticos como os produzidos por antagonistas bacterianos. As leveduras geralmente têm exigências nutritivas simples e podem colonizar superfícies secas por períodos de tempo longos. Utilizam rapidamente nutrientes disponíveis, sendo capazes de crescer em várias fontes de carbono e de fornecer grande quantidade de biomassa em tempo relativamente pequeno. As modalidades sugeridas de ação das leveduras no biocontrole, provavelmente não se constituem em nenhum perigo para o consumidor. Além disso, as células das leveduras contêm quantidades elevadas de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais e diversos trabalhos demonstram o efeito benéfico da adição das leveduras no alimento (BAPTISTA, 2001; DRUVEFORS, 2004).

As leveduras são promissores agentes de controle de doenças vegetais, tanto no campo quanto em pós-colheita. Seu uso bem sucedido poderia ser atribuído ao fato de que as leveduras são um componente principal das superfícies das folhas e outras partes aéreas das plantas. Além disso, podem ser eficazes enquanto agentes do biocontrole por estarem adaptados naturalmente a estes nichos, sendo capazes de produzir antibióticos e enzimas que degradam parede celular, de induzir resistência de tecidos do hospedeiro, e de produzir reguladores de crescimento, podendo colonizar e competir rápida e eficazmente por nutrientes e espaço em superfícies aéreas das plantas (DROBY et al., 1999; DI PIERO et al., 2005; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006).

Mais de dez gêneros de levedura foram avaliados e mostraram-se promissores para controlar doenças em plantas, especialmente na pós-colheita de frutas, como os gêneros *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Sporothrix*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*,

Sporobolomyces, *Metschnikowia*, *Tilletiopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Pichia* e *Candida* (LIMA et al., 1998; CASTORIA et al., 2001; MASIH & PAUL 2002; SANTOS et al., 2004; SANSONE et al., 2005; FILONOW, 1998; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006).

Há atualmente três produtos comerciais produzidos a partir de leveduras disponíveis no mercado internacional para combater doenças em pós-colheita em fruta. Aspire® (Ecogen, Inc., Langhorne, Pa) é composto da levedura *C. oleophila*, sendo usado através de pulverização ou imersão contra doenças da pós-colheita em frutas de maçã e de citros (JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002; DRUVEFORS, 2004), sendo introduzido comercialmente nos Estados Unidos em 1996. O produto Yield Plus® composto de *Cryptococcus albidus* com atividade antagonista, foi introduzido comercialmente na África do Sul em 1997 pela empresa Anchor Yeast. O produto Yield Plus® é usado como agente de biocontrole contra *Botrytis*, *Penicillium* e *Mucor* em maçã e em pêra e está também sendo avaliado para outras culturas (DRUVEFORS, 2004). Recentemente foi registrado em Israel o produto Shemer®, composto da levedura recentemente identificada *Metschnikowia fructicola* (KURTZMAN & DROBY, 2001) e é eficaz contra uma gama de patógenos da uva, morango e batata doce (DRUVEFORS, 2004).

Atualmente no Brasil, de acordo com PICCININ et al. (2005), existem produtos comerciais que contêm elicitores derivados da parede celular de *S. cerevisiae* na sua composição. Alguns desses produtos estão registrados como biofertilizantes e têm mostrado efeitos positivos no controle de doenças em plantas quando utilizados em conjunto com fungicidas tradicionais, embora publicações científicas não estejam disponíveis até o momento.

2.2.1.1.1 Mecanismos de interação antagonica

Compreender as modalidades da ação dos antagonistas, entre leveduras, ajudará não somente na melhoria de seu desempenho resultando do realce de sua eficácia como agentes do biocontrole, mas também no desenvolvimento dos critérios para a seleção rápida para agentes superiores do biocontrole (EL GHOUTH et al., 1998; SPADORO, 2003; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006).

A atuação dos fungos e das leveduras no controle de doenças ocorre interrompendo algum estágio da doença ou do ciclo de vida do patógeno e isto é conseguido através de diversos mecanismos diferentes. Estes agentes biológicos do controle podem atuar na prevenção da infecção, redução na colonização de tecidos do hospedeiro, ou na redução da

esporulação ou da sobrevivência do patógeno, podendo proporcionar diferentes níveis de controle da doença (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

O mecanismo pelo qual o agente de biocontrole inibe o patógeno alvo geralmente não é facilmente compreendido, porque é extremamente difícil montar experimentos que isolem todos os mecanismos possíveis no complexo ambiente do biocontrole. Para a maioria de organismos de biocontrole são atribuídas diversas modalidades da ação, e um único mecanismo dificilmente seja responsável por um efeito integral de biocontrole (JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002; GERHARDSON, 2002).

Embora em determinados casos como para a bactéria *Bacillus thuringiensis* produzindo a toxina de BT se tenha um conhecimento detalhado da modalidade da ação, este não é o caso da maioria dos agentes microbiano de biocontrole. É geralmente raro que somente um mecanismo opere sozinho em suprimir uma praga ou uma doença. Um agente bem sucedido do biocontrole é equipado geralmente com diversos caracteres, que agem frequentemente em conjunto, e que pode também ser crucial para o resultado final. Provavelmente poucos organismos exerçam um único mecanismo antagônico. A possibilidade de um antagonista interferir nos processos vitais dos fitopatógenos através de mais de um mecanismo se constitui em uma característica muito desejável, pois as chances de sucesso do controle biológico serão aumentadas e as chances do patógeno adquirir resistência ao agente serão diminuídas. Além disso, os mecanismos não são mutuamente exclusivos ou excludentes, pois sua importância relativa pode variar com as condições ambientais e estado de desenvolvimento do agente biocontrolador e do fitopatógeno (GERHARDSON, 2002).

A multiplicidade de modos de ação das leveduras aumenta a possibilidade e ação sobre o conjunto de patógenos que ataca uma cultura, bem como a associação entre leveduras antagonísticas pode complementar seu espectro de ação. Testando misturas com combinação de linhagens de leveduras, com diferentes modos de ação e com diferentes capacidades antagonísticas contra os patógenos de maçã *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*, CALVO et al. (2003) observaram sinergismo na ação dos agentes de biocontrole sobre os patógenos.

Além da multiplicidade de modos de ação, o sucesso de um agente de biocontrole pode estar ligado a presença de características específicas, como por exemplo, habilidades específicas de colonizar e de competir, de germinar e crescer a partir de uma quantidade mínima de esporos, habilidades de aderência aos locais específicos, de exsudação de tipos específicos de enzimas, antibióticos (solúvel em água e ou volátil) ou metabolitos ativos, ou habilidade de induzir a resistência da planta (GERHARDSON, 2002).

Durante os últimos vinte anos, diversos agentes biológicos de controle foram investigados extensamente para o uso em patógenos e em diferentes culturas. Muitos mecanismos biológicos do controle foram sugeridos incluindo a antibiose, a competição por nutrientes e espaço (FILONOW, 1998; JANISIEWICZ et al., 2000), produção de enzimas que degradam parede celular como β -1,3-glucanase e quitinase (CASTORIA et al., 2001; MASIHI & PAUL, 2002; URQUHART & PUNJA, 2002), produção de metabólitos solúveis e voláteis antifúngicos (WALKER et al., 1995; MASIHI et al., 2001), indução da resistência do hospedeiro (WILSON et al., 1994; DROBY et al., 2002; EL GHOUTH et al., 2003), e micoparasitismo (ARRAS et al., 1998; BETTIOL, 1991; BETTIOL & GHINI, 2003; SPADARO, 2003; DRUVEFORS et al., 2005; ELMER & REGLINSKI, 2006; EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM, 2006).

2.2.1.1.2 Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* no controle de doenças em plantas

2.2.1.1.2.1 Caracterização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

De acordo com SERTKAYA (2005) as linhagens da espécie *S. cerevisiae* são as leveduras melhor conhecidas e comercialmente as mais importantes. *S. cerevisiae* possui a seguinte classificação taxonômica (COMPLETELY..., 2007):

Supereino: Eukaryota
 Reino: Fungi
 Filo: Ascomycota
 Classe: Saccharomycetes
 Ordem: Saccharomycetales
 Família: Saccharomycetaceae
 Gênero: *Saccharomyces*
 Espécie: *cerevisiae*

As células da levedura são usadas na indústria de panificação, como suplemento alimentar, alimentação animal, para a produção de álcool e glicerol, para a produção de enzimas tal como a invertase e galactosidase, na produção de vitaminas incluindo as vitaminas B e D, para a produção da cerveja, whiskey, vinho, conhaque, vodka e rum. A levedura também é usada extensivamente em tecnologias ambientais tais como o bioremediação, utilização de resíduos, proteção de plantas cultivadas e biosorção de metais. As leveduras estão sendo usadas também em processos biotecnológicos para produzir novas espécies de proteínas e outras moléculas para o uso farmacêutico, sendo *S.*

cerevisiae o organismo mais atrativo para hospedar genes para expressão ou elevar a expressão de tais compostos (SERTKAYA, 2005).

S. cerevisiae contém um conjunto haplóide de 16 cromossomos bem caracterizados, sendo que a seqüência total do DNA cromossomal é constituída de 12.068 kilobases definindo potencialmente 5885 genes (GOFFEAU et al., 1996).

O conhecimento já existente relativo à fisiologia, bioquímica e genética das leveduras fez com que a mesma fosse escolhida como modelo básico de célula biológica para o estudo de processos metabólicos complexos. Por serem eucarióticas, são convenientemente adequadas para os estudos de processos biológicos peculiares dos organismos eucarióticos. Além disso, são organismos unicelulares, facilmente manipuláveis, normalmente não patogênicos, capazes de crescer em várias fontes de carbono e de fornecer grande quantidade de biomassa em tempo relativamente pequeno (BAPTISTA, 2001)

S. cerevisiae é um ascomiceto leveduriforme, cujo crescimento da colônia se dá por brotação das células, não existindo micélio. É amplamente distribuída na natureza, sendo comumente encontrada na superfície de frutos. Sua composição varia em função de diversos fatores, como o substrato no qual é cultivada, o método de fermentação, o modo e as condições de secagem e a idade das células, no entanto, nitrogênio, carbono, hidrogênio e oxigênio normalmente representam cerca de 94% da matéria seca. Os carboidratos representam 45 a 55% do peso da levedura, sendo representados, em média por 33% de trealose, 27% de glucanas, 21% de mananas e 12% de glicogênio (BLUMER, 2002).

MAKOWER & BEVAN² (1963), citados por MAGLIANI et al. (1997), estudando *S. cerevisiae* descreveram pela primeira vez o fenômeno *killer*, pela observação que determinadas linhagens da levedura produziam toxinas que mataram linhagens sensíveis da mesma espécie. Inicialmente, supôs-se que a levedura *killer* matava somente as leveduras que pertenciam à mesma espécie ou espécies próximas, entretanto, muitas toxinas da levedura *killer* podem afetar outras leveduras, bactérias e fungos filamentosos (DRUVEFORS, 2004).

Trabalhos posteriores sobre a característica *killer* de *S. cerevisiae* e de algumas outras leveduras foram realizados e demonstraram que até 30% das linhagens *S. cerevisiae* selvagens isoladas de vários habitats foram capazes de matar uma linhagem padrão sensível de *Candida glabrata* (CZARAN et al., 2002).

2 MAKOWER, M.; BEVAN, E. A. The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON GENETICS 11., 1963, Oxford. **Resumos**. Oxford: Pergamon, 1963. p. 203.

O sistema *killer* de *S. cerevisiae* é o mais completamente investigado. Atualmente, as leveduras *killer* que pertencem a esta espécie foram classificadas em três grupos principais (K1, K2, e K28) com base nas características moleculares das toxinas secretadas, de seus perfis da matança e características genéticas (MAGLIANI et al., 1997).

Em *S. cerevisiae*, o fenômeno *killer* está associado à presença de um plasmídio RNA de fita dupla (M-dsRNA) e partículas virais localizadas no citoplasma (L-A dsRNA vírus), caracterizado os sistemas *killer* K1, K2 e K28, havendo além destes os sistemas *killer* KHR e KHS originados do DNA. O dsRNA viral da levedura não tem nenhum efeito adverso relatado para a célula do hospedeiro (MAGLIANI et al., 1997; SERTKAYA, 2005).

As toxinas *killer* são proteínas ácidas com ponto isoelétrico aproximado de pH 4,0, sendo a maioria com massa molecular entre 10-20 kDa, cujo mecanismo de ação ainda é pouco conhecido. Há indícios que estas toxinas atuam na membrana de células sensíveis, reduzindo o pH intracelular e causando conseqüente extravasamento de íons potássio e ATP, entre outros. Muitas toxinas de leveduras são glicoproteínas formadoras de prótons capazes de originar canais iônicos, resultando em desestabilização do potencial eletroquímico da membrana e eventual morte celular (MAGLIANI et al., 1997; COELHO, 2005; COMITINI et al., 2004). A toxina K1 de *S. cerevisiae* possui massa molecular de 19 kDa e atua ligando-se ou receptor β -1,6-D-glucana presente na parede celular da célula sensível, levando à formação dos poros na membrana celular e acarretando na perda da viabilidade da célula (MAGLIANI et al., 1997; COMITINI et al., 2004).

Apesar de possuir uma estrutura diferente a toxina K2, de massa molecular de 21,5 kDa, tem a atividade praticamente idêntica à toxina K1. No entanto, a toxina K28, que possui massa molecular de 21,5 kDa, parece agir de uma maneira diferente. A toxina K28 liga primeiramente a uma α -1,3-manose ligada a uma manoproteína de 185-kDa da parede da célula, causando a interrupção do ciclo da célula, aparentemente na fase G2, e conduzindo à não separação entre a célula da mãe e a filha, com o DNA nuclear confinado à célula da mãe. Estão presentes também em *S. cerevisiae* o sistema *killer* KHR, uma toxina de massa molecular de 20 kDa, resistente ao calor e o sistema *killer* KHS, cuja toxina possui massa molecular de 70 kDa, sensível ao calor, com bases genéticas cromossomal, que atuam ligando-se a um receptor ainda não conhecido, levando ao aumento da permeabilidade da membrana a íons (MAGLIANI et al., 1997).

SOARES & SATO (2000) caracterizaram uma proteína de peso molecular de cerca de 18 a 20 kDa responsável pela característica *killer* na linhagem Y500-4L de *S. cerevisiae*. A produção máxima da toxina foi obtida após 24 horas de incubação a 25 °C em meio YEPD. A toxina *killer* apresentou maior atividade na faixa de pH 4,1-4,5 e temperatura de

22-25 °C; e maior estabilidade na faixa de pH 3,8-4,5 a 10 °C, sendo totalmente inativada após 1 hora de incubação a 40 °C em pH 4,1.

Um fator proteináceo produzido por uma linhagem *S. cerevisiae* usada na vinificação teve efeito bacteriostático ou bactericida dependente da concentração, inibindo o crescimento da bactéria *Oenococcus oeni* e conversão do ácido L-málico para L-lático em suco de uva, um processo desejável em certos vinhos brancos e na maioria de vinhos tintos (COMITINI et al., 2005).

2.2.1.1.2.2 Atuações de *Saccharomyces cerevisiae* no controle biológico de doenças em plantas

Embora algumas pesquisas tenham sido conduzidas no exterior (CHEAH & HUNT, 1994; REGLINSKI et al., 1994; CHEAH & MARSHALL, 1995; CHEAH & TRAN, 1995; REGLINSKI et al., 1995; WALKER et al., 1995; BECKERMAM & EBBOLE, 1996; BECKERMAM et al., 1997; FILONOW, 2001), a maior parte dos estudos sobre o uso de *S. cerevisiae* no controle de doenças em plantas foram realizados no Brasil pelos pesquisadores da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico em São Paulo e pela equipe coordenada pelo professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ/USP (DI PIERO et al., 2005).

Há na literatura consultada vários exemplos de sucesso no uso de *S. cerevisiae* na proteção de plantas cujos mecanismos prováveis de ação são antibiose, competição e a indução de resistência.

Trabalhos de HAHN & ALBERSHEIM (1978) e de CLINE et al. (1978) demonstraram a capacidade da levedura interferir no metabolismo das plantas levando à produção de compostos de defesa, quando as glucanas isoladas de *S. cerevisiae* mostraram-se ativas em tecidos de várias plantas, como soja, feijão, batata e outras, estimulando a produção de fitoalexinas.

De acordo com PASCHOLATI (1998), embora HAHN & ALBEERSHEIM em 1978 terem caracterizado parcialmente um elicitor de gliceolina a partir de extrato de *S. cerevisiae*, Martins e colaboradores foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem a possibilidade da proteção de planta pelo uso da levedura. A aplicação de preparações de filtrados obtidos de *S. cerevisiae* induziu resistência contra a ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix* Berk, et Br em folhas destacadas, não tendo sido observada ação direta sobre o patógeno no que se refere a germinação de urediniósporos e a formação de apressórios (MARTINS et al., 1986; MARTINS, 1991).

Estudando o efeito de *S. cerevisiae* sobre *H. vastatrix* em plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), ROVERATTI (1989) constatou que suspensões de células vivas, lavadas, autoclavadas e seus respectivos filtrados, obtidos da levedura na forma de produto comercial reduziram a germinação, o número de lesões nas folhas e a formação de urediniósporos do patógeno. A proteção proporcionada, na opinião da autora, deu-se por antibiose, uma vez que estes efeitos não foram observados nas folhas anteriores e posteriores ao local de aplicação, indicando assim que neste caso a proteção observada não foi sistêmica.

Plantas de sorgo pré-tratadas com o fermento biológico apresentaram aumento no acúmulo de compostos fenólicos em resposta à inoculação com *Colletotrichum sublineolum*, sugerindo que a levedura pode modificar o metabolismo da planta no sentido de induzir resistência contra o patógeno (LOPEZ, 1991).

Suspensões de células de *S. cerevisiae*, preparadas a partir do produto comercial em diluições acima de $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ e com aplicação do inóculo do patógeno até 24 horas depois da aplicação da levedura, reduziram a germinação, formação de apressórios e o desenvolvimento da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* em milho. Os filtrados das suspensões celulares, suspensões contendo células lavadas de *S. cerevisiae*, obtida do produto comercial, bem como suspensões de células da levedura e o seu filtrado também reduziram o desenvolvimento de *C. graminicola* e a manifestação da doença nas folhas (SILVA 1989; SILVA & PASCHOLATI, 1992).

Os autores constataram ainda que, a proteção obtida não foi sistêmica, uma vez que, o efeito sobre o patógeno nas folhas próximas ao local de aplicação de *S. cerevisiae* não foi semelhante ao observado no local de aplicação, havendo, contudo, nestas folhas vizinhas uma redução da área foliar lesionada. O fato do filtrado de *S. cerevisiae* ter efeito sobre *C. graminicola* levou os autores a concluir que a ação antagonista da levedura foi por antibiose.

No patossistema milho-*Exserohilum turcicum*, *S. cerevisiae* atuou diretamente sobre o patógeno por antibiose reduzindo a germinação e a penetração de conídios, e também induziu resistência no hospedeiro, reduzindo o tamanho e o número de lesões e a esporulação do patógeno no tecido do hospedeiro (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994).

Testando diversas preparações obtidas a partir da parede celular de *S. cerevisiae* com interesse de obter um produto comercial, REGLINSKI et al. (1994) observaram uma redução de até 90% da infecção causada por *Erysiphe graminis* em folhas de cevada, sendo o mecanismo de ação da levedura apontado como a indução de resistência, uma vez que foi observado a formação de papilas e aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia-

liase. Em experimento de campo, REGLINSKI et al. (1994) obtiveram resultados que corroboraram os dados iniciais, obtendo aumento da resistência ao míldio causada por *E. graminis*, redução da perda no rendimento de grão e em alguns casos o aumento do rendimento se deu a níveis que se aproximaram daqueles obtidos com uso de fungicida.

CHEAH & HUNT (1994) avaliando o efeito de *S. cerevisiae* no comportamento pós-colheita de kiwi observaram uma redução de 61% na incidência de podridão causada por *B. cinerea*. Segundo os autores a competição por espaço e nutrientes foi o mecanismo responsável pelo efeito favorável do tratamento com a levedura. A competição por espaço e nutriente também foi o modo de ação apontado por CHEAH & MARSHALL (1995) como responsável pelo efeito de *S. cerevisiae* na redução de 51% na incidência de *Fusarium sambucium* em abobrinha (*Curcubita maxima*) e também por CHEAH & TRAN (1995) na redução de 100% da incidência de *Penicillium digitatum* em limão.

Também se obteve resultados positivos com uso de *S. cerevisiae* sobre o patossistema *Xantomonas campestris* pv. *passiflora* - maracujá azedo (*Passiflora edulis*), onde foi observada redução no número de lesões e atraso na manifestação dos sintomas (PICCININ, 1995).

S. cerevisiae Inibiu o crescimento de *Penicillium roqueforti* em grão de trigo armazenados (PETERSSON & SCHNURER, 1995).

Os extratos obtidos da parede celular de *S. cerevisiae* solúvel em água não apresentaram efeito *in vitro* contra *B. cinerea* e *Rhizoctonia solani*, no entanto, reduziram em até 90% a infecção por *B. cinerea* em folhas de alface destacadas e em casa-de-vegetação reduziram em até aproximadamente 70% a infecção por *B. cinerea* e *R. solani*. Também constatada a capacidade destes extratos induzirem o acúmulo de fitoalexina em cotilédones de soja, indicando atuação da levedura por indução de resistência (REGLINSKI et al., 1995).

O potencial de utilização do fator *killer* de *S. cerevisiae* foi demonstrado *in vitro* por WALKER et al. (1995), quando a levedura inibiu o crescimento de diversos fungos causadores de doenças em plantas e podridões em madeira tais como *Ceratocystis pilifera*, *Erysiphe graminis*, *Venturia inaequalis*, *Heterobasidium annosum*, *Serpula lacrymans*, *Postia placenta*, *Lentinus lepideus*, *Coniophora puteana*, *Puccinia recondita*, *Cercospora arachidicola*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, *B. cinerea*, *Botrytis fabae*, *Phoma foveata*, *Plasmopara viticola*, *Phytophthora infestans lycopersicii* e *Phytophthora infestans*. De acordo com os autores, o fator *killer* atuou provocando lise nas células, baseado na observação que a exposição a *S. cerevisiae* causou vacuolização da hifa e pigmentação do micélio dos patógenos.

Os carboidratos isolados da parede celular de *S. cerevisiae* obtida do produto comercial e linhagens de laboratório em contato com os tecidos de soja atuaram como elicitor da fitoalexina gliceolina (GUZZO & MORAES 1997; MENDES-COSTA & MORAES, 1998). A indução do acúmulo de gliceolina por *S. cerevisiae* também foi observada em cotilédones de soja por SCHWAN-ESTRADA et al. (2000).

Preparações de células da levedura ou seus filtrados, tratados ou não termicamente, alteraram a atividade da peroxidase em tecidos de milho e sorgo (RONCATTO & PASCHOLATI, 1998). As alterações ocorridas na atividade da enzima nesses tecidos, quando do tratamento com *S. cerevisiae*, provavelmente, segundo os autores, deve-se ao fato da planta "reconhecer" a levedura ou seus metabólitos e, portanto, alterar o metabolismo normal em resposta ao possível invasor.

S. cerevisiae reduziu significativamente o crescimento de *Penicillium verrucosum in vitro* e também reduziu o acúmulo da micotoxina ochratoxin A abaixo do limite de detecção (PETERSSON et al., 1998).

FILONOW (1998) constatou que as leveduras *Cryptococcus laurentii*, *Sporobolomyces roseus* e *S. cerevisiae* inibiram a germinação de conídios de *B. cinerea* em soluções estéreis contendo fructose, glucose e sucrose e em suco de maçã diluído. As leveduras esgotaram rapidamente os açúcares das soluções. Na opinião do autor, a competição por açúcares, aliada a outros fatores, desempenhou um importante papel no efeito contra o patógeno.

Extratos de *S. cerevisiae* inibiram *in vitro* a formação de apressórios em conídios germinados de *Magnaporthe grisea*, agente causal da brusone do arroz, sendo esta inibição devido à presença do hormônio fator- α de *S. cerevisiae*, um peptídeo com 13 aminoácidos, que poderia interagir com um receptor específico para algum hormônio no patógenos bloqueando o desenvolvimento dos apressórios. Preparações do fator- α da levedura ou seu análogo sintético aplicadas em folhas de plântulas de cevada reduziam a área foliar lesionada pela redução no número de lesões, enquanto que o tamanho das lesões não era alterado (BECKERMAM & EBBOLE, 1996; BECKERMAM et al., 1997).

A maçã produz muitos compostos voláteis diferentes. Alguns destes mostraram-se capazes de afetar a germinação e o crescimento dos fungos. Os ésteres acetato (acetatos etila, butila e hexila) em baixa concentração favoreceram a germinação de conídios de *B. cinerea*, a presença das leveduras *S. cerevisiae* e de modo mais significativo *Cryptococcus laurentii* e *Sporobolomyce roseus* reduziram este o efeito estimulatório (FILONOW, 1999).

WULFF & PASCHOLATI (1998) realizaram a purificação parcial e a caracterização bioquímica de um elicitor glicoprotéico presente na parede celular de *S. cerevisiae* e

constataram que este foi capaz de induzir a síntese de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo.

PAYNE et al. (2000)³, citados por PAYNE & BRUCE (2001) e EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM (2006) relataram que *S. cerevisiae* e *Debaryomyces* sp. inibiram o crescimento radial *in vitro* de fungos causadores de manchas, unicamente com o liberação de compostos antifúngico voláteis.

FILONOW (2001) constatou que na presença de acetato de butila *S. cerevisiae* reduziu a incidência de podridão por *B. cinerea* em frutos de maçã feridas artificialmente, não interferindo, contudo, no diâmetro das lesões nos frutos atacados.

Avaliando agentes bióticos, LOPES (2001) obteve 91% de redução na severidade em folhas de *Eucalyptus grandis* tratadas com *S. cerevisiae* 24 horas antes da inoculação de *B. cinerea*.

A aplicação exógena de *S. cerevisiae* altera a fisiologia de *Arabidopsis* promovendo um fluxo de entrada de Ca^{2+} nas células guardas, aumentando a concentração do cátion no citossol e determinando o fechamento estomático, sendo que a ativação deste mecanismo é dependente de NADPH do citossol. Paralelamente a este evento a levedura interfere na rota de sinalização que leva a resposta de defesa da planta (KLÜSENER et al., 2002).

LABANCA (2002), procedendo à purificação de *S. cerevisiae*, obteve dois compostos elicitores, não fitotóxicos, um deles provavelmente uma manana. Estes elicitores foram capazes de induzir a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja, de induzir resistência em pepino contra *Colletotrichum lagenarium* e aumentar a atividade de peroxidases.

De acordo com CARDOSO FILHO (2003), *S. cerevisiae* reduziu a germinação e formação de apressório por *Phyllosticta citricarpa* agente causal da pinta preta em citros *in vitro*, porém não inibiu o aparecimento de novas lesões em frutos de laranja em pós-colheita. Para o autor o efeito *in vitro* da levedura sobre o patógeno poderia ser atribuído à liberação de uma substância ou complexo de substâncias com atividade inibitória.

Também avaliando o efeito *in vitro* de *S. cerevisiae* sobre *G. citricarpa*, FIALHO (2004) obteve resultado semelhante e também atribuiu à antibiose o modo de ação da levedura, tendo sido constatado um efeito inibidor do crescimento do patógeno associado a um composto volátil produzido por *S. cerevisiae*. Comparando diferentes linhagens, o autor constatou que a levedura inibiu em até 73% o crescimento micelial de *G. citricarpa*, efeito este não observado nos tratamentos com filtrado de cultura, filtrado de cultura autoclavado e

3 PAYNE, C.; BRUCE, A.; STAINES, H. Yeast and bacteria as biological control agents against fungal discolouration of *Pinus sylvestris* blocks in laboratory-based tests and the role of antifungal volatiles. *Holzforschung*, Berlim, v.54, p.563–569, 2000.

levedura autoclavado, não tendo sido, além disto, detectada a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, tais como quitinase e β -1,3-glucanase.

Oligoglicídios isolados da parede de células de *S. cerevisiae* eliciaram o acúmulo de fitoalexinas em cotilédone de fumo (GANG-LIANG et al., 2004).

A aplicação de Agro-MOS[®], um produto comercial obtido a partir da parede celular de *S. cerevisiae*, induziu o aumento da atividade da enzima β -1,3-glucanase e reduziu a incidência de antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão na fase pós-colheita (DANTAS et al., 2004).

A proteção de frutos de mamão por *S. cerevisiae* contra *C. gloeosporioides* também foi observada por CIA (2005). A autora, contudo, atribuiu o efeito da levedura sobre o patógeno à antibiose e competição, uma vez que, células vivas da levedura inibiram o crescimento micelial de *C. gloeosporioides in vitro* e reduziram a incidência de antracnose, não tendo sido constatadas alterações nas atividades das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase nos frutos.

S. cerevisiae inibiu 52,3% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides in vitro* e em condição de campo a levedura reduziu a incidência de antracnose nas flores e aumentou o número e a massa média dos frutos da mangueira. Na pós-colheita os frutos tratados em pré-colheita tiveram o aparecimento dos sintomas retardados e a incidência foi reduzida em 50% (VIVEKANANTHAN et al., 2004).

O uso de *S. cerevisiae* proporcionou proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) reduzindo o número de lesões e severidade da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola*, sendo que a produtividade de grãos em plantas tratadas com a levedura não diferiu daquela obtida com o sorgo tratado com fungicida (PICCININ et al., 2005).

Os avanços científicos na área de biologia molecular e engenharia genética têm permitido melhorias importantes na eficiência de leveduras no controle de doenças em plantas (MAGLIANI et al., 1997; SPADARO, 2003). Por meio de técnicas moleculares uma linhagem de *S. cerevisiae* não produtora de um peptídeo foi transformada, expressando o caráter *killer* (GOTO et al., 1991). O dsRNA viral de *Zygosaccharomyces bailii* que codifica a produção da toxina *killer* zigocina foi transferido para células de linhagens não *killer* de *S. cerevisiae*, que passou a expressar de modo estável o fenótipo *killer* pela produção da toxina (SCHMITT & NEUHAUSEN, 1994; SCHMITT & BREINIG, 2002). Células de *S. cerevisiae* transformadas geneticamente para expressar a produção de cecropin, um peptídeo de ação lítica, inibiram o crescimento de *Colletotrichum coccodes* e o desenvolvimento de sintomas em frutos do tomate (JONES & PRUSKY, 2002).

A transformação genética de *S. cerevisiae* possibilita melhorar os efeitos de antibiose e indução de resistência por parte da levedura, por exemplo, através da introdução de genes que expressem elicitores de interesse. A vantagem em relação às plantas transgênicas residiria no fato de que a aplicação da levedura transformada poderia ser feita sobre uma ampla faixa de espécies vegetais, no campo e pós-colheita (DI PIERO et al., 2005).

Os resultados das pesquisas com *S. cerevisiae* estimularam a empresa Improcrop do Brasil, uma subsidiária da Alltech Biotechnology, a formular um produto comercial com nome de Agro-MOS®, cujo princípio ativo é constituído por elicitores oriundos da parede celular de *S. cerevisiae*, produto este registrado no Brasil como biofertilizante. O produto tem apresentado efeitos positivos no controle de doenças em videira, batata e tomate (DI PIERO et al., 2005) e em pós-colheita de frutos de mamão (DANTAS et al., 2004).

De acordo com PICCININ et al. (2005) apesar da atual existência de produtos comerciais contendo elicitores derivados da parede celular de *S. cerevisiae* na sua composição, faltam, contudo, dados científicos sobre a ação dos produtos.

2.3 REFERÊNCIAS

ABH - Associação Brasileira de Horticultura. Guia Nutricional: Morango. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/Nutricao/Default.asp?id=1776>>. Acesso em 24 março 2007.

ARRAS, G.; DE CICCIO, V.; ARRU, S.; LIMA, G. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. **Journal Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford Kent, v.73, p.413-418, 1998.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.F. Freeman, 1974. 433p.

BAPTISTA, A. S. **Saccharomyces cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinas**. Piracicaba, 2001. 81p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

BATTA, Y. A. Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v.43, n. 1, p.143-150, 2007.

BECKERMAN, J. L.; EBBOLE, D. J. MPG1, a gene encoding a fungal hydrophobin of *Magnaporthe grisea*, is involved in surface recognition. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.9, n.6, p.450-456, 1996.

BECKERMAN, J. L.; NAIDER, F.; EBBOLE, D. J. Inhibition of pathogenicity of the rice blast fungus by *Saccharomyces cerevisiae* α -factor. **Science**, Washington, v.276, n.5315, p. 1116-1119, 1997.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In CAMPANHOLA, C.; BETIOL, W. (Org.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna**. Embrapa Meio Ambiente, 2003. p.79-95.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1991. cap.1, p.1-5.

BLANCO, C.; SANTOS, B.; ROMERO, F. Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.114, n.4, p. 415-425, 2006.

BLUMER, S. A. G. **Enriquecimento com ferro em *Saccharomyces cerevisiae***. Piracicaba, 2002. 53p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

BOFF, P.; KRAKER, J.; GERLAGH, M.; KOHL, J. Importância das pétalas no desenvolvimento do mofo-cinzento do morangueiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 28, n.1, p.76-83, 2003.

BONALDO, S. M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. Piracicaba, 2005. 150p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade Pelotas: Embrapa Clima Temperado; de São Paulo.

BRACKMANN, A.; HUNSCHE M.; BALEM T. A. Efeito de filmes de PVC esticável e polietileno no acúmulo de CO₂ e na manutenção da qualidade pós-colheita de morangos cv. Tangi. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.5, n.2, p.89-92, 1999.

BRACKMANN, A.; HUNSCHE, M.; WACLAWOVSKI, A. J.; DONAZZOLO, J. Armazenamento de morangos cv. Oso Grande (*Fragaria ananassa* L.) sob elevadas pressões parciais de CO₂. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.1, p.10-14, 2001.

CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M. I. S. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v.43, n.4, p.167-172, 1999.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.186-191, 2002.

CALVO, J.; CALVENTE, V.; DE ORELLANO, M. E.; BENUZZI, D.; DE TOSETTI, M. I. S. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. **BioControl**, Dordrecht, v.48, n.5, p.579–593, 2003.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In CAMPANHOLA, C.; BETIOL, W. (Org.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente, 2003. p.13-51.

CARDOSO FILHO, J. A. **Efeito de Extratos de Albedo de Laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-S-Metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. Piracicaba, 2003. 126p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v.22, n.1, p.7-17, 2001.

CHEAH, L. H.; MARSHALL, A. P. Biological control of *Fusarium* storage rot of squash with yeasts. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 48., 1995, Hastings. **Anais**. Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1995. p.337-339.

CHEAH, L. H.; TRAN, T. B. Postharvest biocontrol of *Penicillium* rot of lemons with industrial yeasts. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 48., 1995, Hastings. **Anais**. Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1995. p.155-157.

CHEAH, L.H.; HUNT, A.W. Screening of industrial yeasts for biocontrol of *Botrytis* storage rot in kiwifruit. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 47., 1994, Waitangi. **Anais**. Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1994. p.362-363.

CIA, P. 2005. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. Piracicaba, 2005. 197p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

CLINE, K.; WADE, M.; ALBERSHEIM, P. Hostpathogen interaction. XV. Fungal glucans which elicit phytoalexin accumulation in soybean also elicit the accumulation of phytoalexin in other plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.62, n.6, p.918-921, 1978.

COELHO, A. R. **Controle de *Penicillium expansum* / biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita**. Londrina, 2005. 131p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina.

COMITINI, F.; FERRETTI, R.; CLEMENTI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.99, n.1, p.105-111, 2005.

COMITINI, F.; INGENIIS, J.; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera* *Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.238, n.1, p.235-240, 2004.

COMPLETELY Sequenced Genomes Yeasts. Disponível em: <<http://www.nslj-genetics.org/seq/yeast.html>>. Acesso em 12 março 2007.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos e agronômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.3, p.419-423, 2002.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

CZARAN, T. L.; HOEKSTRA, R. F.; PAGIE, L. Chemical Warfare between Microbes Promotes Biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, n.2, p.786-790, 2002.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p.314-319, 2004.

DELHOMEZ, N.; CARISSE, O.; LAREAU, M.; KHANIZADEH, S. Susceptibility of strawberry cultivars and advanced selections to leaf spot caused by *Mycosphaerella fragariae*. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.3, p. 592-595, 1995.

DI PIERO, R. M.; GARCIA, D.; TONNUCCI, N. M. . Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; REZENDE, M. L.; ROMEIRO, R.; PASCHOLATI, S. F. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p. 29-50.

DIAS, M. S. C.; COSTA, H.; CANUTO, R. S. Manejo de doenças do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n.236, p.64-77, 2007a.

DIAS, M. S. C.; SILVA, J. J. C.; PACHECO, D. D.; RIOS, S. A.; LANZA, F. E. Produção de morangos em regiões não tradicionais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n.236, p.24-33, 2007b.

DOMINGUES, R. J.; TÖFOLI, J. G.; OLIVEIRA, S. H. F.; GARCIA JUNIOR, O. Controle Químico da flor preta (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) do morangueiro em condições de campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, n.2, p.37-42, 2001.

DROBY, S.; COHEN, L.; DAUS, A.; WEISS, B.; HOREV, B.; CHALUTZ, E.; KATZ, H.; KEREN-TZUR, M.; SHACHNAI A. Commercial Testing of Aspire: A Yeast Preparation for the Biological Control of Postharvest Decay of Citrus. **Biological Control**, Orlando, v.12, n.2, p. 97-101, 1998.

DROBY, S.; LISCHINSKI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; CHAND-GOYAL, T.; ECKERT, J. W.; MANULIS, S. Characterization of an Epiphytic Yeast Population of Grapefruit Capable of Suppression of Green Mold Decay Caused by *Penicillium digitatum*. **Biological Control**, Orlando, v.16, n.1, p.27–34, 1999.

DROBY, S.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; PORAT, R. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, Palo Alto, v.92, n.4, p.393-399, 2002.

DRUVEFORS, U. A. **Yeast biocontrol of grain spoilage moulds. Mode of Action of *Pichia anomala***. Uppsala, 2004. 122p. Tese de Doutorado. Swedish University of Agricultural Sciences.

DRUVEFORS, U. A.; PASSOTH, V. SCHNÜRER, S. Nutrient Effects on Biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during Airtight Storage of Wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.4, p.1865-1869, 2005.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defense: Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.41, p. 501-38, 2003.

EI GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, Palo Alto, v.93, n.3, p.344-348, 2003.

EI GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. **Phytopathology**, Palo Alto, v.88, n.4, p.282-291, 1998.

ELMER, P. A. G.; REGLINSKI, T. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. **Plant Pathology**, London, v.55, n.2, p.155–177, 2006.

EI-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, n.1, p.25-35, 2006.

ESHENAUR, B. C.; MILHOLLAND, R. D. Factors influencing the growth of *Phomopsis obscurans* and disease development on strawberry leaf and runner tissue. **Plant Disease**, Saint Paul, v.73, n.10, p.814-819, 1989.

FERNANDES-JÚNIOR, F.; FURLANI, P. R.; RIBEIRO, I. J. A.; CARVALHO, C. R. L. Produção de frutos e estolhos do morangueiro em diferentes sistemas de cultivo em ambiente protegido. **Bragantia**, Campinas, v.61, n.1, p.25-34, 2002.

FIALHO, M. B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. Piracicaba, 2004. 60p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeasts in biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v.8, n.2, p.243-256, 1998.

FILONOW, A. B. Butyl acetate and yeasts interact in adhesion and germination of *Botrytis cinerea* conidia *in vitro* and in fungal decay of golden delicious apple. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.27, n.4, p.831-844, 2001.

FILONOW, A. B. Yeasts reduce the stimulatory effect of acetate esters from apple on the Germination of *Botrytis cinerea* conidia. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.25, n.7, p.1555-1565, 1999.

FORTES, J. F. Doenças. In: SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. (Ed.). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.61-64. (Frutas do Brasil, 40).

FRAVEL. D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.337-359, 2005.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; KOLESNIK, I.; BARBUL, O.; ZVEIBIL, A.; MAYMON, M.; NITZANI, Y.; KIRSHNER, B.; RAV-DAVID, D.; BILU, A.; DAG, A.; SHAFIR, S.; ELAD, Y. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.110, n.4, p.361-370, 2004.

GANG-LIANG, H.; MAN-XI L.; XIN-YA M. Synthesis, (1→3)-β-D-glucanase-binding ability, and phytoalexin-elicitor activity of a mixture of 3,4-epoxybutyl (1→3)-β-D-oligoglucosides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v.339, n.8, p.1453-1457, 2004.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.20, n.8, p.338-343, 2002.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, Washington, v.274, n.5287, p.546-567, 1996.

GOTO, K.; FUKUDA, H.; KICHISE, K.; KITANO, K.; HARA, S. Cloning and Nucleotide Sequence of the KHSkiller Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and Biological chemistry**, Tokyo, v.55, n.8, p.1953-1958, 1991.

GUERBER, J. C.; LIU, B.; CORRELL, J. C.; JOHNSTON, P. R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, Lawrence, v.95, n.5, p.872-895, 2003.

GUZZO, S.D.; MORAES, W.B.C. Purificação e caracterização parcial de um elicitor de fitoalexina em soja, a partir de urediniosporos de *Hemileia vastatrix*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.396-402, 1997.

HAHN, M. G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions: XIV. Isolation and parcial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology**, Rockville, v.62, n.1, p. 107-111, 1978.

HELBIG, J. Biological Control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in Strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, n.5, p.265-273, 2001.

HENZ, G. P.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. Outbreak of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in central Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, n.2, p.212-212, 1992.

HEYDARI, A.; MISAGHI, I.J. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.202, n.1, p.109-116, 1998.

JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.11, p.1196–1200, 2000.

JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.411-441, 2002.

JONES, R.W.; PRUSKY, D. Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: a new approach for biological control of postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. **Phytopathology**, Sant. Paul, v.92, n.1, p.33-37, 2002.

KLÜSENER, B.; YOUNG, J. J.; MURATA, Y.; AILEN, G. J.; MORI, I. C.; HUGOUVIEUX, V.; SCHROEDER J. I. Convergence of Calcium Signaling Pathways of Pathogenic Elicitors and Absciscic Acid in Arabidopsis Guard Cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, n.4, p. 2152-2163, 2002.

KURTZMAN, C. P.; DROBY, S. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 24, n.3, 395-399, 2001.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Piracicaba, 2002. 118p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LEANDRO, L. F. S.; GLEASON, M. L.; NUTTER, F. W. JunioR.; WEGULO, S. N.; DIXON, P. M. Influence of temperature and wetness duration on conidia and appressoria of

Colletotrichum acutatum on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n.4, p.513-520, 2003.

LEANDRO, L. F. S.; GLEASON, M. L.; NUTTER, F. W., Jr.; WEGULO, S. N., ; DIXON, P. M. 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v.91, n.7, p.659-664, 2001.

LIMA, G.; ARRU, S.; CURTIS, F.; ARRAS, G. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, London, v.23, n.3, p.223–229, 1999.

LIMA, G.; DE CURTIS, F.; CASTORIA, R.; DE CICCIO, V. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v.8, n.2, p.257-267, 1998.

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v.10, n.2, p.169-178, 1997.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas Hidrolíticas Envolvidas no Controle Biológico por Micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Controle Biológico**. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.2, p.263-304, 2000.

LOPES, E. A. G. L. **Controle biológico de *Botrytis cinerea* in vitro e em mudas de *Eucalyptus* sp.** Lavras, 2001. 45p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras.

LOPEZ, A. M. Q. **Controle alternativo da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench).** Rio Claro, 1991. 94p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista.

MADDEN, L. V.; BOUDREAU, M. A. Effect of strawberry density on the spread of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, n.8 p. 828-838, 1997.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast Killer Systems. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.10, n.3, p.369–400, 1997.

MARTINS, E. M. F. Controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1991. p.345-363.

MARTINS, E. M. F.; DE MARIA, A.C.; GRÜNEWALDT-STÖCKER, G.; MORAES, W.B.C. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat treatment. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p. 899-909, 1986.

MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of β -1,3-Glucanases by the Yeast *Pichia membranifaciens* and Its Possible Role in the Biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing Grey Mold Disease of the Grapevine. **Current Microbiology**, New York , v. 44, n.4, p.391-395, 2002.

MASIH, E. I.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; MARMARAS, I.; AIT BARKA, E.; VERNET, G.; CHARPENTIER, C.; ADHOLEYA, A.; PAUL, B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.202, n.2, p.227-232, 2001.

MENDES-COSTA, M. C.; MORAES, W. B. C. Acúmulo de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja por frações lisadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, n.2, p.141-147, 1998.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W.; GHINI, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Org.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. 1 ed. Viçosa: EPAMIG, 2005, v. , p. 247-268.

NITA, M.; ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V. Effects of temperature, wetness duration, and leaflet age on infection of strawberry foliage by *Phomopsis obscurans*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, n.5, p.579-584, 2003.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**. <<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/biolcon>>. Acesso em 06 abril 2007.

PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. Piracicaba, 1998. 123p. Tese de Livre-docência. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PAULITZ, T. C.; BELANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.103-133, 2001.

PAYNE, C.; BRUCE, A. The yeast *Debaryomyces hansenii* as a shortterm biological control agent against fungal spoilage of sawn *Pinus sylvestris* timber. **Biological Control**, Orlando, v.22, n.1, p.22-28, 2001.

PETERSSON, S.; HANSEN, M. W.; AXBERG, K.; HULT, K.; SCHNÜRER, J. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n.8, p. 1003-1008, 1998.

PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. Biocontrol of Mold Growth in High-Moisture Wheat Stored under Airtight Conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.3, p.1027-1032, 1995.

PICCININ, E. **Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp) contra fitopatogenos fúngicos e bacterianos**. Piracicaba: 1995, 170p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.1, p.5-9, 2005.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.21, n.9, p.400-407, 2003.

RABELO, J. A.; BALARDIN, R. S. A cultura do morangueiro. 3.ed. ver. e ampl. Florianópolis: EPAGRI, 1997. 44p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 46).

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P.; FACHINELLO. Caracterização e diversidade genética de cultivares de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, n. 1, p.84-87, 2006.

REGLINSKI, T.; LYON, G. D.; NEWTON A. C. Assessment of the ability of yeast-derived elicitors to control barley powdery mildew in the field. **Journal Of Plant Diseases And Protection**, Stuttgart, v.101, n.1, p.1-10, 1994.

REGLINSKI, T.; LYON, G. D.; NEWTON A. C. The control of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce using elicitors extracted from yeast cell walls. **Journal Of Plant Diseases And Protection**, Stuttgart, v.102, n.3, p.257-266, 1995.

REICHERT, L. J.; MADAIL, J. C. M. Aspectos Socioeconômicos. In: SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A.R.M. (Ed.). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.12-15. (Frutas do Brasil, 40).

RIGON, L.; CORRÊA, S.; REETZ, E.; VENCATO, A.; ROSA, G. R.; BELING, R. R. Pequenas frutas. **Anuário Brasileiro da Fruticultura**, Santa Cruz do Sul, v.1, n.1, p.90-97, 2005.

ROMEIRO, R. S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Viçosa: Editora UFV, 1999. 45p.

RONCATTO, M. C.; PASCHOLATI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.3, p.395-402, 1998.

ROVERATTI, D. S. **Proteção de plantas de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk, et Br, por *Saccharomyces cerevisiae***. Piracicaba, 1989. 93p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SANSONE, G.; REZZA, I.; CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; SANZ DE TOSETTI, M.I. "Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts" **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.35, n.3, p.245-251, 2005.

SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. Introdução. In: SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. (Ed.) **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.24-30. (Frutas do Brasil, 40).

SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, Spencers Wood, v.150, n.8, p.2527-2534, 2004.

SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, Jena, v.159, n.4, p.331-338, 2004.

SANTOS, P. E. T. Características básicas das principais cultivares de morango plantadas no Brasil. In PEREIRA, D. P.; BANDEIRA, D. L.; QUINCOZES, E. R. F. (Ed) Sistema de Produção do Morango. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap02.htm>>. Acesso em 06 maio 2007.

SCHMID, A.; DANIEL, C.; WEIBEL, F. Effect of cultural methods on leaf spot (*Mycosphaerella fragariae*) and gray mold (*Botrytis cinerea*) damage in strawberries. **BioControl**, Dordrecht, v.50, n.1, p.179-194, 2005.

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.26, n.3, p.257-276, 2002.

SCHMITT, M.J.; NEUHAUSEN, F. Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. **Journal Virology**, Washington, v.68, p.1765-1772, 1994.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v.30, n.1-2, p. 129-137, 2000.

SERTKAYA, A. **Investigation of cytotoxic effect of K5 type yeast killer protein on sensitive microbial cells**. Ankara, 2005. 87p. Dissertação de Mestrado. Middle East Technical University.

SILVA, S. R. **Aspecto do controle da antracnose em plantas de milho (*Zea mays* L.), mantidas em casa-de-vegetação, pelo emprego de *Saccharomyces cerevisiae*.** Piracicaba: 1989. 81p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SILVA, S. R. da; PASCHOLATI, S. F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v.99, n.2, p.159-167, 1992.

SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4I killer toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.291-297, 2000.

SPADARO, D. **Biological control of postharvest diseases of pome fruit using yeast antagonists.** Torino, 2003. 134p. Tese de Doutorado. Università Degli Studi Di Torino.

SPADARO, D.; VOLA, R.; PIANO, S.; GULLINO, M.L. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v.24, n.2, p.123-134, 2002.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.20, p.16-21, 1994.

TANAKA, M. A. S. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias em morangueiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA H. (Ed.) **Controle de Doenças de plantas: fruteiras.** 1 ed. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2002, v.1, p. 69-140.

TANAKA, M. A. S.; BETTI, J. A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.), **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p.489-499.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n.5, p.484-488, 2002.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A.; BETTI, J. A. Resistência de *Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum* ao benomyl na cultura do morango no estado de São Paulo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.54, n.3, p.139-146, 1997.

URQUHART, E. J.; PUNJA, Z. K. Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, p.219-229, 2002.

VIVEKANANTHAN, R.; RAVI, M.; SARAVANAKUMAR, D.; KUMAR, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. **Crop Protection**, Guildford, v.23, n.12, p.1061-1067, 2004.

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.127, n.3, p.213-222, 1995.

WILSON, C. L.; EI GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J. Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, n.9, p.837-844, 1994.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.1, p.138-143, 1998.

ZHANG, H. Y.; ZHENG, X. D.; FU, C. X.; XI, Y. F. Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Ryptococcus laurentii*. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v.35, n.1, p.79-86, 2005.

ZHANG, H.; WANG, L.; DONG, Y.; JIANG, S.; CAO, J.; MENG, R. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. **Biological Control**, Orlando, v.40, n.2, p.287-292, 2007a.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; YU, T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. **Food Control**, Oxford, v.18, n.4, p.287-291, 2007b.

3 CAPÍTULO I – CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES E DE FLORES E METABOLISMO DO MORANGUEIRO APÓS TRATAMENTO COM *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, sobre o desenvolvimento das doenças do morangueiro, mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) e flor-preta (*Colletotrichum acutatum*), bem como avaliar o mecanismo de ação da levedura nesses sistemas patógeno-hospedeiro. O trabalho foi realizado na UTFPR-Campus Dois Vizinhos e os tratamentos consistiram de pulverizações semanais de cinco diferentes preparados a partir da levedura *S. cerevisiae*: suspensão com fermento biológico fresco comercial, suspensão de células de levedura, suspensão autoclavada de células, filtrado de cultura em meio líquido e Agro-MOS®, um produto comercial formulado a partir da levedura, além da testemunha com água destilada e do tratamento controle com fungicidas. Nenhuma das preparações apresentou efeito duradouro contra a mancha-de-micosferela; preparações com a presença de células vivas e o produto Agro-MOS® apresentaram efeito contra mancha-de-dendrofoma; preparações com suspensão do produto comercial e filtrado de cultura líquida reduziram a incidência de flor-preta em flores e frutos; preparações de *S. cerevisiae* com suspensão de células, suspensão autoclavada de células e filtrado de cultura líquida promoveram aumento na produtividade dos morangueiros; e as preparações de *S. cerevisiae*, com presença de células vivas ou não, alteraram o metabolismo do morangueiro, aumentando a atividade de enzimas envolvidas na resistência sistêmica adquirida quitinases e glucanases.

Palavras-chave: *Fragaria* x *ananassa*, antibiose, antagonismo, resistência sistêmica adquirida.

LEAF AND FLOWER DISEASES CONTROL AND METABOLISM OF STRAWBERRY PLANTS AFTER TREATMENT WITH *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The present work had the objective of evaluating the effect of different preparations of the *Saccharomyces cerevisiae* over the development of diseases in the strawberry plant, as well as evaluating the mechanism of action the yeast has in the pathogen-host systems. This

work was carried out in 2004 and 2005 at Federal University of Technology - Parana, *Campus Dois Vizinhos* - PR. The treatments consisted of spraying five different preparations of the yeast *S. cerevisiae*, suspension of the commercial available fresh biological yeast, suspension of the yeast cells, suspension of the autoclaved cells, filtered of culture in liquid medium and Agro-MOS[®], control treatments, with water spraying and another one with fungicides. None of the preparations presented effective and lasting effect against the mycosphaerella leaf spot (*Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau (1897)); preparations with the presence of alive cells and the product Agro-MOS[®] presented effect against leaf blight *Dendrophoma obscurans* (Ellis & Everh.) H.W. Anderson (1920); preparations with suspension of commercial product and filtered of liquid culture reduced the incidence of anthracnose (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds (1965)) in flowers and fruits; preparations of *S. cerevisiae* with suspension of cells, suspension of autoclaved cells and filtered of liquid culture promoted increase in the productivity of the strawberry plants; and the preparations of *S. cerevisiae*, with the presence of alive cells or not, modified the metabolism of the strawberry plant, increasing the activity of enzymes involved in the acquired systemic resistance chitinases and glucanases.

keywords: *Fragaria x ananassa*, antibiosis, antagonism, sistemic acquired resistance.

3.1 INTRODUÇÃO

A cultura do morangueiro desempenha um importante papel socioeconômico, pois é desenvolvida em pequenas propriedades e com necessidade de mão-de-obra em todo seu ciclo, gerando emprego e renda. Com o crescimento da área explorada com o morango, entretanto, intensificam-se os problemas fitossanitários que acompanham a cultura (REICHERT & MADIAL, 2003).

Um dos problemas atuais de maior gravidade é a alta incidência de doenças. A forma predominante de controle destas doenças é com o uso intensivo de agrotóxicos, o que tem levado à graves problemas, como surgimento de populações de patógenos resistentes a fungicidas, aumento do custo de produção, resistência ao consumo do fruto ocasionadas pelo uso em larga escala de agrotóxicos, além dos problemas de ordem ambiental (FERNANDES JR. et al., 2002; TANAKA et al., 1997).

Diante da necessidade de minimizar esse problema e atender a demanda de alimentos de maior qualidade, produtores e pesquisadores buscam formas alternativas de manejo fitossanitário. Dentre as diversas estratégias destacam-se o controle biológico e a indução de resistência à doenças de plantas. Em ambas as alternativas, a levedura

Saccharomyces cerevisiae é apontada por diversos autores como tendo um grande potencial de utilização. A levedura tem sido estudada na proteção de plantas de diversas espécies vegetais atuando por diferentes mecanismos. *S. cerevisiae* pode induzir resistência em plantas contra doenças, além de atuar diretamente sobre o patógeno por antibiose ou competição, tendo sido encontrados resultados positivos no controle de doenças e no aumento da produtividade (LOPES, 2001; CARDOSO FILHO, 2003; DANTAS et al., 2004; FIALHO, 2004; CIA, 2005; BONALDO, 2005; PICCININ et al., 2005).

Diante dos resultados positivos obtidos na proteção de plantas contra patógenos por *S. cerevisiae* e da inexistência de informação sobre o efeito da levedura sobre as doenças do morangueiro, realizaram-se dois experimentos visando avaliar o efeito de diferentes preparações de *S. cerevisiae* sobre o desenvolvimento das doenças do morangueiro mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) e flor-preta (*Colletotrichum acutatum*), além de avaliar o mecanismo de ação da levedura no sistema patógeno-hospedeiro, bem como relacionar os resultados dos tratamentos com a produtividade dos morangueiros.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 EXPERIMENTO 1- Avaliação de manchas foliares e flor preta

3.2.1.1 Delineamento experimental e implantação do experimento

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Dois Vizinhos, situada a 25°, 42', 52" S e 53°, 03', 94" W, a 519 metros acima do nível do mar. O solo local é do tipo Latossolo Vermelho Distroférico Típico (EMBRAPA, 1984) e o terreno apresenta em torno de 3% de declividade média.

Trinta dias antes do plantio previsto foi aplicado calcário com base no resultado das análises químicas do solo (Anexo I) e posteriormente incorporado. O experimento foi implantado em maio de 2004, utilizando-se o delineamento experimental blocos ao acaso com quatro repetições, com parcelas de 1,20 m X 1,20 m composta por 16 plantas, espaçadas 0,30 m uma das outras, formando quatro fileiras de quatro plantas. Foram utilizadas mudas da cultivar Camarosa importadas do Chile, conduzidas em sistema de túnel baixo com irrigação por gotejamento. Foi colocada uma cobertura no solo com filme de polietileno preto 30 dias após o plantio. A adubação de base foi realizada por ocasião do plantio e após a colocação da cobertura por fertirrigação com base no resultado das

análises químicas do solo (Anexo I) e na recomendação de adubação para a cultura proposta por SANTOS & MEDEIROS (2003).

3.2.1.2 Obtenção dos tratamentos

Os tratamentos consistiram na pulverização semanal da levedura *S. cerevisiae* em cinco diferentes preparações, sendo T1 - suspensão com fermento biológico fresco comercial (30 mg.mL^{-1}); T2 - suspensão de células de levedura ($1 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$); T3 - suspensão autoclavada de células ($1 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$); T4 - filtrado de cultura em meio líquido ($0,1 \text{ mL.mL}^{-1}$); T5 – Agro-MOS® (AM), um produto formulado a partir da levedura, relatado como indutor de resistência a doenças em plantas (DANTAS et al., 2004) ($0,002 \text{ mL.mL}^{-1}$); T6 - testemunha (água); e T7 – controle (TM+F+I, clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione), que consistiu na aplicação de uma combinação de fungicidas a cada sete dias com uso de clorotalonil+tiofanato-metílico ($0,049 \text{ g.L}^{-1}$) até o florescimento e posteriormente alternou-se folpete ($0,0135 \text{ g.L}^{-1}$) e Iprodione ($0,075 \text{ g.L}^{-1}$). As suspensões com fermento biológico fresco (T1) foram obtidas a partir do produto comercial Itaiquara®, adquirido no comércio local semanalmente. As preparações de *S. cerevisiae* (T2 e T3) foram obtidas de isolamento a partir do produto comercial e posteriormente cultivada em meio YEPG, contendo: 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glicose, 20 g de ágar e 1000 mL de água. Semanalmente, a levedura foi repicada para placas de Petri com o meio e mantidas a 26°C por 48 h. Posteriormente, as células foram suspensas em água destilada e a concentração ajustada em $1 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$ com uso de câmara de Neubauer, sendo que parte da suspensão, destinado ao tratamento 3, foi autoclavada a 120°C por 20 min.

Para obtenção do filtrado (T4) a levedura foi cultivada em estufa a 26°C sob agitação orbital (90 rpm) por 48 h em meio YEPG líquido. O material resultante foi esterilizado por meio de filtração em membrana de nitrocelulose com diâmetro de poro de $0,2 \mu\text{m}$ e posteriormente diluído em água.

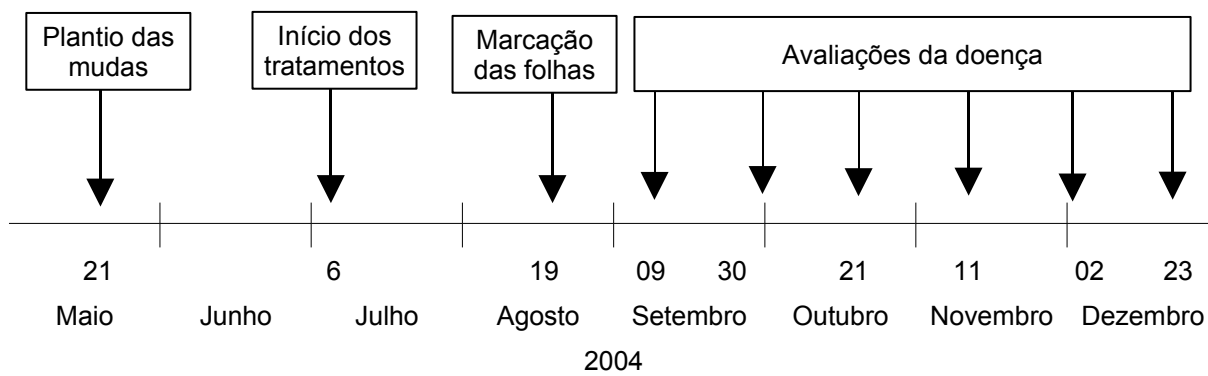
O início dos tratamentos com a aplicação dos elicitores se deu aos 45 dias após o plantio. As aplicações foram repetidas a cada sete dias até o final do ciclo da cultura, perfazendo um total de 25, sendo o volume de calda usado nos tratamentos e de água destilada no tratamento testemunha em média de 30 mL por planta.

3.2.1.3 Avaliação das doenças

Para a avaliação das doenças foliares mancha-de-micosferela e mancha-de-dendrofoma foram realizadas contagens do número de folhas com sintomas das doenças a cada 21 dias (Quadro 1 e 2). Foram avaliadas as quatro plantas centrais de cada parcela. A incidência foi definida pelo percentual de folhas atacadas em relação ao total de folhas das plantas avaliadas. A partir da quarta avaliação, as folhas com sintomas de mancha-de-dendrofoma que vinham sendo avaliadas se desintegraram impossibilitando a continuidade da avaliação da doença, uma vez que não se observou o surgimento de novas lesões.

Com base nos dados obtidos foi determinada a área abaixo da curva de progresso da incidência da doença, utilizando-se da seguinte fórmula: $AACPD = \sum [(I_i + I_{i+1}) \cdot 2^{-1} \cdot (T_{i+1} - T_i)]$, onde AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença; I_i = incidência na época da avaliação i e T_i = idade da planta na época da avaliação i .

Quadro 1 - Cronograma das atividades desenvolvidas visando quantificar a mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*) em morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

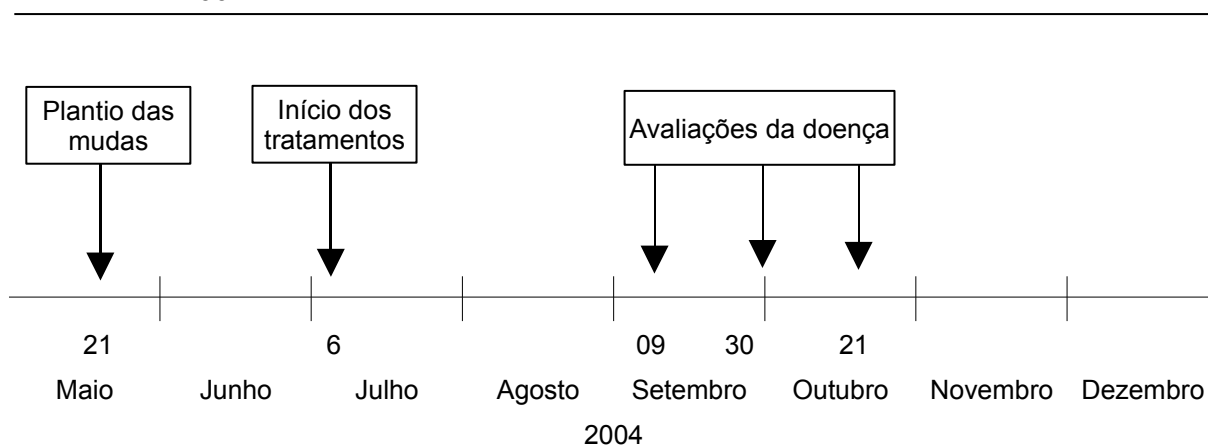


Para a mancha-de-micosferela, foi determinada também a área abaixo da curva de progresso da severidade. Em cada uma das quatro plantas úteis foram marcadas duas folhas no início da avaliação e nestas realizada, em cada data de avaliação, a contagem do número de lesões causadas por *M. fragariae*. Entre a quarta e a quinta avaliação, foram realizadas, com auxílio de um paquímetro, medições visando determinar o diâmetro das lesões nas oito folhas marcadas de cada tratamento. Também, em cada época de avaliação foram coletados seis folíolos em cada repetição para a determinação da área foliar, realizada por meio do medidor de área WINRHIZO. Com base no diâmetro da lesão foi

estimada a área média da lesão. A área total lesionada foi obtida multiplicando-se a área média das lesões pelo número de lesões por folha. A severidade, dada pela percentagem de área foliar lesionada, foi determinada com base na relação entre a área foliar média e a área lesionada de cada tratamento, em cada época de avaliação.

A área abaixo da curva de progresso da severidade da doença foi determinada pela seguinte fórmula: $AACPD = \Sigma[(P_i \cdot S_i) + (P_{i+1} \cdot S_{i+1}) \cdot 2^{-1} \cdot (T_{i+1} - T_i)]$, onde AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença; P_i = proporção de folhas com lesões na época da avaliação i ($P_i = I_i / 100$); S_i = severidade da doença na época da avaliação i ; T_i = idade da planta na época da avaliação i .

Quadro 2 - Cronograma das atividades desenvolvidas visando quantificar a mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) em morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

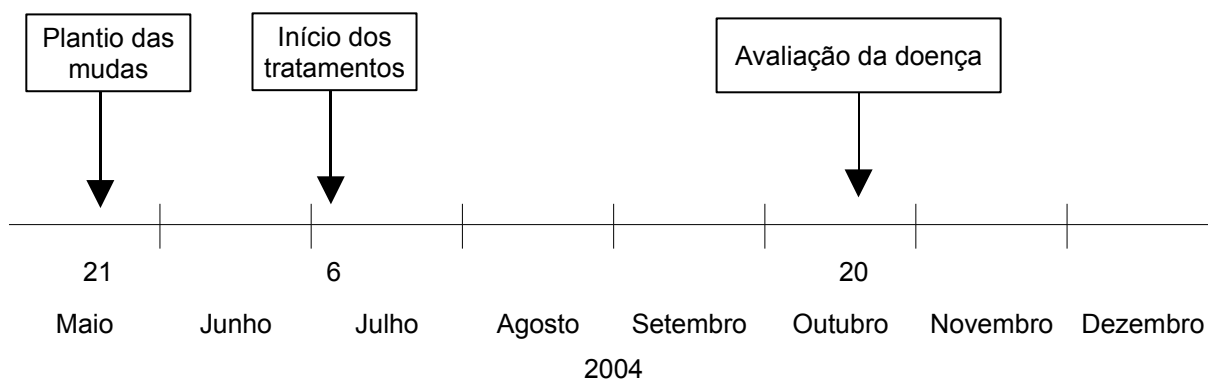


Para a avaliação da antracnose foi efetuada a quantificação da incidência de sintomas típicos do ataque do patógeno (Quadro 3), caracterizado pela necrose das flores e frutos jovens, deformações em frutos verdes e manchas deprimidas nos frutos maduros (TANAKA & PASSOS, 2002).

Para avaliar o possível impacto da antracnose sobre a produtividade, comparou-se entre os tratamentos o número médio de frutos colhidos uma semana anterior e uma semana posterior à data de avaliação da doença.

Para auxiliar na análise do comportamento das doenças foram obtidos dados de temperatura e umidade coletados na estação meteorológica da Usina Hidrelétrica de Salto Osório em Quedas do Iguaçu-PR situada a 25° 31' S e 53° 01' W a 513 metros acima do nível do mar, obtidos junto ao SIMEPAR.

Quadro 3 - Cronograma das atividades desenvolvidas visando quantificar a flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) em morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.



3.2.1.4 Avaliação da produtividade e crescimento foliar

Para a avaliação da produtividade, as colheitas foram realizadas em média a cada três dias, sendo os frutos não comerciáveis descartados e os demais contados e pesados em balança de precisão. A produtividade média foi obtida somando-se a massa dos frutos de todas as colheitas e dividindo-se pelo número de plantas da parcela.

Para a avaliação do crescimento foliar considerou-se o número médio de folhas por planta em cada data de avaliação, tendo-se como base as quatro plantas centrais de cada parcela.

3.2.2 EXPERIMENTO 2 - Avaliação bioquímicas

3.2.2.1 Delineamento experimental

Para a avaliação bioquímica nas plantas o experimento foi repetido em 2005, utilizando os tratamentos: T1 - suspensão de células de levedura (1×10^5 células.mL⁻¹); T2 - suspensão autoclavada de células (1×10^5 células.mL⁻¹); T3 - filtrado de cultura em meio líquido (0,1 mL.mL⁻¹); T4 – Agro-MOS® (AM) (0,002 mL.mL⁻¹); T5 - testemunha (água); e T7 – controle (TM), que consistiu na aplicação de clorotalonil+tiofanato-metílico (0,0049%). A aplicação dos tratamentos ocorreu 45 dias após o plantio, utilizando-se um pulverizador

costal com capacidade de cinco litros. A aplicação dos tratamentos e a coleta das amostras se deram conforme apresentado no Quadro 4.

3.2.2.2 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas em tecidos foliares (proteínas totais, açúcares totais e redutores) foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia da Universidade Federal do Paraná – Curitiba. Para tanto, 24, 72, 120 e 168 h após a aplicação dos tratamentos, foram coletados discos foliares com 2 cm de diâmetro da região mediana de folíolos centrais de folhas completamente expandidas, evitando-se aquelas que pela coloração aparentavam muito jovens ou muito velhas. Imediatamente após as coletas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -20°C até as avaliações.

Para dosagem de proteínas totais, as amostras de tecido foliar foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000 g por 10 min. a 4°C) e o sobrenadante coletado. Para quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras foi empregado o teste de BRADFORD (1976), com leitura em espectrofotômetro, modelo UV-1601-Shimadzu à 630 nm, usando soro albumina bovina como solução padrão.

As concentrações de açúcares solúveis totais foram determinadas pelo método fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS et al. (1956). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2 M - pH 7,5, centrifugadas por 5 min. a 10.000 g. Utilizou-se 2 μL do extrato e adicionou-se 0,5 mL de fenol a 5,0% e 2,5 mL ácido sulfúrico concentrado. A leitura das amostras foi realizada a 490 nm. A concentração de açúcares totais foi determinada através de curva padrão de glicose.

As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 10 mL de tampão fosfato 0,2 M – pH 7,5, centrifugadas por 10 min. a 14.000 g a 4°C . Utilizou-se 0,5 μL do extrato e adicionando-se 1,0 mL de água destilada e 1,0 mL reagente DNS. A leitura das amostras foi realizada a 540 nm. A concentração de açúcares redutores foi calculada em função de curva padrão de glicose.

As análises da atividade das enzimas quitinases e β -1,3-glucanases foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo - Piracicaba/SP.

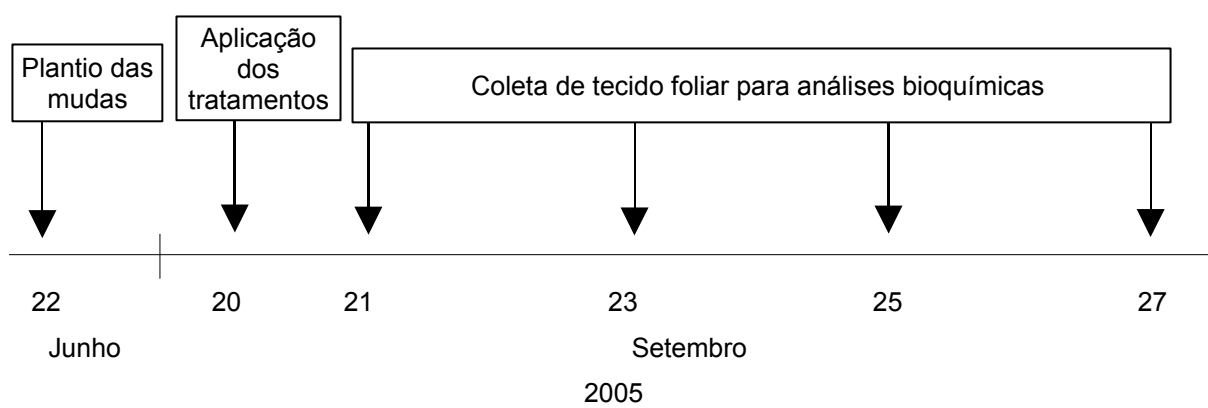
Para dosagem das atividades de quitinases e β -1,3-glucanases as amostras foram maceradas em 4,0 mL de tampão de extração, acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior

centrifugação (20.000 *g* por 25 min. a 4 °C). O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado e 200 µL utilizados para a avaliação da atividade das enzimas.

A atividade enzimática das quitinases foi avaliada por meio da liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada, marcada com remazol brilhante violeta (CM-chitin-RBV). Para tanto, 200 µL do extrato proteico foram misturados a 600 µL do mesmo tampão de extração e a 200 µL de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg.mL⁻¹). Após incubação por 20 min. a 40 °C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1,0 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000 *g* por 5 minutos. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada como referência e os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.g de proteína⁻¹, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 µL de tampão de extração e 200 µL de “CM-chitin-RBV”) (STANGARLIN et al., 2000).

Para a determinação espectrofotométrica das atividades de β-1,3-glucanases nos extratos foi utilizado como substrato uma solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg.mL⁻¹, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por WIRTH & WOLF (1992) e com o procedimento descrito por GUZZO & MARTINS (1996). Para tanto, 200 µL do extrato protéico foi misturado com 600 µL do mesmo tampão de extração e 200 µL de CM-curdlan-RBB (4,0 mg.mL⁻¹). Após incubação por 20 min. a 40 °C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1,0 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000 *g* por 5 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 600 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.g de proteína⁻¹.

Quadro 4 - Cronograma das atividades desenvolvidas visando avaliar o metabolismo de morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2005.



3.2.2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à avaliação de homogeneidade pelo teste de Bartlett a 5% de probabilidade de erro. As médias não homogêneas foram transformadas por \sqrt{x} e os valores expressos em percentual por $\text{arc.sen } \sqrt{x/100}$ e, posteriormente, submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro, com a utilização do software SASM Agri.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito contra a mancha-de-micosferela

A levedura *S. cerevisiae* apresentou efeito sobre a incidência da mancha-de-micosferela na fase inicial da avaliação, sendo os resultados obtidos com o uso das preparações, na maioria dos casos, equivalentes ao tratamento controle (TM+F+I), feito com a utilização de fungicidas, considerando-se como parâmetros o número de lesões, incidência e severidade da doença (Tabelas 1, 2 e 3). Na primeira avaliação, os tratamentos com levedura viva e o tratamento com levedura autoclavada promoveram redução na percentagem da incidência de lesões da doença (Tabela 2). Este resultado sugere efeito da levedura sobre *M. fragariae*, sobretudo nas formas de levedura viva, que poderia ter atuado por competição. Todavia, nenhuma das preparações de *S. cerevisiae* testadas interferiu de forma permanente e efetiva no desenvolvimento da mancha-de-micosferela, considerando todo o período avaliado, como pode ser evidenciado na análise da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da incidência e da severidade (Tabela 4).

O tratamento controle (TM+F+I), contudo, apresentou efeito sobre a mancha-de-micosferela, que apresentou a AACPD da incidência e da severidade inferiores a observada nos demais tratamentos. O tratamento com combinação de fungicidas reduziu a incidência e a severidade da mancha-de-micosferela em relação aos tratamentos testemunha e com filtrado da cultura de *S. cerevisiae* (Tabelas 2 e 3).

A interferência dos tratamentos sobre o desenvolvimento da mancha-de-micosferela possivelmente ocorreu após o estabelecimento do patógeno, durante a colonização, uma vez que não foi observada diferença nos diâmetros das lesões entre os diferentes tratamentos (Tabela 4).

Tabela 1- Número de lesões causadas por *Mycosphaerella fragariae* por folha em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamento	Número de lesões por folha					
	Dias após a 1ª avaliação					
	0	21	42	63	84	105
Levedura comercial	2,1 ^{ns}	4,0 ab	6,0 ab	7,4 ab	8,1 a	8,1 ab
Suspensão de células	1,4	3,3 ab	5,1 ab	6,3 ab	7,5 ab	7,0 ab
Suspensão autoclav. de células	1,4	3,3 ab	5,3 ab	6,1 ab	5,8 ab	5,4 ab
Filtrado de cultura líquida	2,2	4,7 a	7,2 a	7,6 ab	9,0 a	9,4 a
AM	1,3	3,0 a	4,7 ab	6,0 ab	5,1 ab	5,6 ab
Testemunha	1,1	2,9 ab	4,8 ab	9,3 a	8,2 a	9,3 ab
TM+F+I	1,0	2,1 b	3,1 b	2,8 b	2,2 b	2,8 b
Coeficiente de Variação (%)	22,8	20,6	23,0	27,8	33,7	31,7

Médias seguidas de mesmas letras ou “ns” nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

Os dados obtidos em relação ao diâmetro da lesão não apresentaram diferenças entre os tratamentos, indicando que os tratamentos não afetaram a via anti-horária de infecção pelo patógeno, não promovendo a formação de compostos ou resposta de hipersensibilidade que pudessem restringir o crescimento da lesão. Por outro lado, os tratamentos com preparações de *S. cerevisiae* reduziram a incidência de lesões na folha (Tabela 2) e o tratamento com combinação de fungicidas reduziu o número e a incidência de lesões na folha (Tabelas 1 e 2). A avaliação conjunta destes parâmetros indica que os tratamentos afetaram a via horária de infecção do patógeno, através de mecanismos que impediram o surgimento de novas lesões.

Considerando a ação por competição de *S. cerevisiae* sobre a mancha-de-micosferela observado na primeira avaliação onde os tratamentos com a levedura viva reduziram a incidência da doença, a impossibilidade de se estabelecer diferenças entre qualquer um dos tratamentos com levedura e o tratamento testemunha, a partir da segunda avaliação, pode ser atribuído a interferência a fatores climáticos, sobretudo a temperatura e umidade que poderiam ter mudado para valores mais favoráveis ao patógeno que ao antagonista. Após a primeira avaliação de doenças ocorreu um aumento da temperatura, cujos valores médios oscilaram entre 20 e 25 °C, associado a manutenção da umidade, cujos valores médios mantiveram-se acima de 70% na maior parte dos dias (Figura 2), criando condições ideais ao desenvolvimento de *M. fragariae* (TANAKA & PASSOS, 2002).

Tabela 2- Incidência de mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamento	Incidência (%)					
	Dias após a 1ª avaliação					
	0	21	42	63	84	105
Levedura comercial	29,9 c	18,3 a	19,3 a	15,8 b	23,8 ab	24,0 ^{ns}
Suspensão de células	27,8 c	10,0 b	14,6 abc	19,7 ab	24,2 ab	20,8
Suspensão autoclav. de células	31,2 bc	16,2 ab	12,3 bc	17,6 ab	20,4 ab	24,5
Filtrado de cultura líquida	38,8 ab	17,1 ab	19,4 a	25,9 a	24,2 ab	21,7
AM	47,2 a	18,9 a	18,1 a	20,1 ab	27,8 a	25,8
Testemunha	44,6 a	15,5 ab	16,2 ab	17,3 ab	20,3 ab	21,1
TM+F+I	9,5 d	5,1 c	9,6 c	13,4 b	16,8 b	21,8
Coeficiente de Variação (%)	10,3	19,4	12,4	14,6	13,0	9,74

Médias seguidas de mesmas letras ou “ns” nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

Tabela 3- Severidade de mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamento	Severidade (%)					
	Dias após a 1ª avaliação					
	0	21	42	63	84	105
Levedura comercial	0,10 a	0,10 a	0,18 a	0,17 ab	0,22 a	0,24 ^{ns}
Suspensão de células	0,07 a	0,04 ab	0,12 ab	0,18 ab	0,21 a	0,19
Suspensão autoclav. de células	0,07 a	0,05 a	0,10 ab	0,17 ab	0,08 ab	0,14
Filtrado de cultura líquida	0,06 a	0,11 a	0,19 a	0,26 a	0,23 a	0,27
AM	0,05 a	0,08 a	0,13 ab	0,18 ab	0,13 ab	0,15
Testemunha	0,05 a	0,06 a	0,12 ab	0,24 a	0,20 a	0,27
TM+F+I	0,01 b	0,02 b	0,04 b	0,06 b	0,04 b	0,07
Coeficiente de Variação (%)	23,0	32,3	27,5	28,6	34,8	35,8

Médias seguidas de mesmas letras ou “ns” nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

Até a primeira avaliação observou-se uma menor quantidade de folhas por planta, bem como uma maior durabilidade da folha, o que levou a uma alta incidência da doença (Tabela 2). Após a primeira avaliação, com o aumento da temperatura ocorrida a partir de meados de agosto, houve um aumento da emissão de folhas (Figura 3), levando à

redução drástica na incidência da doença. A constante renovação das folhas com a emissão de folhas novas e a senescência de folhas velhas, aparentemente as doentes, mantiveram a incidência da doença em níveis relativamente baixos (Tabela 2).

Apesar da significativa diferença entre o tratamento com fungicidas e os demais tratamentos, quando a análise é feita comparando-se a AACPD da incidência e severidade da mancha-de-micosferela, pode-se notar, pela baixa severidade da doença, que a cultivar utilizada no experimento apresenta resistência contra a doença independentemente de tratamentos, sendo que durante todo ciclo da cultura a área foliar afetada não ultrapassou 0,75 % em nenhuma das repetições. A baixa quantidade de inóculo inicial, em função de ter sido o primeiro ano de cultivo de morango na área também poder ter contribuído para a pouca expressão da doença. Outro fator que pode ter afetado o desenvolvimento da mancha-de-micosferela foi o sistema de cultivo adotado no experimento, sobretudo pelo efeito positivo da cobertura plástica e a irrigação localizada, evitando que os respingos da chuva e da irrigação disseminassem o patógeno.

Tabela 4- Diâmetro médio das lesões e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da incidência e da severidade da mancha-de-micosferela (*Mycosphaerella fragariae*) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamento	Diâmetro da lesão (cm)	AACPD	
		Incidência	Severidade
Levedura comercial	0,42 ^{ns}	2183 abc	17,3 a
Suspensão de células	0,47	1947 c	14,1 a
Suspensão autoclav. de células	0,43	1980 bc	10,5 ab
Filtrado de cultura líquida	0,41	2453 ab	20,5 a
AM	0,37	2547 a	13,0 a
Testemunha	0,43	2146 abc	16,3 a
TM+F+I	0,45	1271 d	4,2 b
Coeficiente de Variação (%)	18,7	10,3	24,7

Médias seguidas de mesmas letras ou "ns" nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

3.3.2 Efeito contra a mancha-de-dendrofoma

Na avaliação da incidência da mancha-de-dendrophoma, constatou-se que na primeira data de avaliação apenas o tratamento com fungicida se destacou, apresentando melhor resultado que a testemunha e o tratamento com suspensão autoclavada de células (Tabela 5). Na segunda data de avaliação, no entanto, a aplicação de *S. cerevisiae* na forma de levedura comercial se destacou, apresentando melhor resultado que a testemunha e que os tratamentos com *S. cerevisiae* nas preparações autoclavada e filtrada, sem a presença de células vivas da levedura antagonista. A abundante emissão de novas folhas, uma característica marcante da cultivar Camarosa nas condições do experimento, não permitiu a distinção das médias entre os tratamentos na terceira avaliação (Tabela 5). A condição de baixa incidência de luz e o alto teor de umidade na região inferior das plantas, onde se encontravam as folhas atacadas por *D. obscurans*, favoreceu a ação de fungos saprófitos e a rápida degradação das folhas com sintomas, impossibilitando a continuidade das avaliações.

Na avaliação da AACPD da mancha-de-dendrofoma, constatou-se que a aplicação de *S. cerevisiae* na forma de levedura comercial e suspensão de células se destacaram, apresentando, semelhantemente ao tratamento com TM+F+I, melhor resultado que o tratamento testemunha (Tabela 5).

Tabela 5- Incidência e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da incidência de mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) em morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamento	Incidência da doença			AACPD
	09/09/04	30/09/04	21/10/04	
Levedura comercial	5,7 ab	3,4 c	8,3 ^{ns}	218 b
Suspensão de células	5,9 ab	5,9 abc	6,7	255 b
Suspen. autoclav. de cél.	8,1 a	7,2 ab	7,2	311 a
Filtrado de cultura líquida	5,6 ab	8,5 a	7,1	311 a
AM	4,1 ab	5,3 abc	9,9	258 b
Testemunha	9,0 a	8,7 a	8,8	370 a
TM+F+I	3,1 b	3,6 bc	8,5	198 b
Coefic. de Variação (%)	24,9	26,1	21,2	13,4

Médias seguidas de mesmas letras ou "ns" nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

Estes dados indicam que a presença de células vivas da levedura foi determinante para o efeito sobre *D. obscurans* e que a competição foi possivelmente o mecanismo mais importante envolvido no processo de defesa da planta contra o patógeno.

A competição por espaço e nutriente tem sido apontada como um importante mecanismo pelo qual *S. cerevisiae* atua no controle de fitopatógenos, como no controle de *B. cinerea* em kiwi (CHEAH & HUNT, 1994), de *Fusarium sambucium* em abobrinha (*Curcubita maxima*) (CHEAH & MARSHALL, 1995) e de *Penicillium digitatum* em limão (CHEAH & TRAN, 1995).

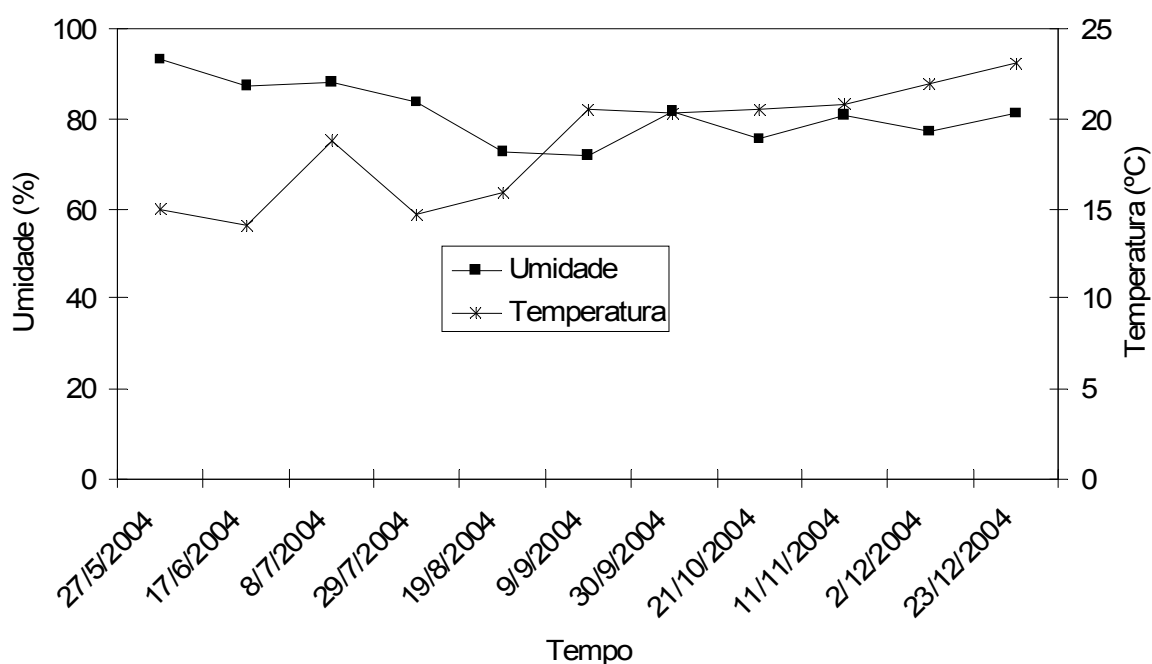


Figura 2- Umidade relativa do ar e temperatura médias dos valores diários dos períodos entre avaliações de doenças foliares em Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004 (Fonte: SIMEPAR).

3.3.3 Efeito contra a flor-preta

O tratamento com filtrado de cultura líquida de *S. cerevisiae* proporcionou os melhores resultados na avaliação da incidência da flor preta em flores e em frutos, bem como na média das estruturas atacadas (Tabela 6). Considerando-se que este tratamento não induziu o aumento da atividade das PRP's (Tabelas 11 e 12), provavelmente, seu efeito foi devido à antibiose, ou seja, algum composto originado no processo de crescimento da levedura atuou negativamente sobre o desenvolvimento do patógeno.

O tratamento com a levedura na forma de fermento comercial também apresentou efeito sobre a flor preta. De acordo com PICCININ et al. (2005), espécies do gênero *Colletotrichum* precisam de fonte de energia externa ao conídio para germinarem. Assim, *S. cerevisiae* poderia ter atuado contra o patógeno competindo por fatores vitais no filopiano. No entanto, o fato de que o tratamento com suspensão de células não apresentou efeito reforça a tese de que algum metabólito produzido no processo de crescimento de *S. cerevisiae*, presente em maior concentração no tratamento com a levedura comercial, afetou diretamente o patógeno.

Tabela 6- Incidência de flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) em flores e frutos de morango, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae* e número médio de frutos colhidos na época da avaliação, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamento	Frutos por planta	Incidência de flor-preta (%)		
		Flores	Frutos	Média
Levedura comercial	2,1 ab	16,5 b	13,8 ab	15,2 bc
Suspensão de células	2,5 a	30,3 ab	18,8 ab	24,5 ab
Suspensão autoclav. de células	2,2 ab	36,3 a	23,3 a	29,8 a
Filtrado de cultura líquida	2,5 a	16,6 b	10,7 b	13,6 c
AM	1,9 b	23,7 ab	18,0 ab	20,8 abc
Testemunha	1,9 b	33,6 ab	18,8 ab	26,2 a
TM+F+I	2,1 ab	23,6 ab	20,2 a	21,9 abc
Coeficiente de Variação (%)	14,2	25,5	19,4	17,1

Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

O efeito de antibiose de *S. cerevisiae* foi observado sobre *Colletotrichum graminicola* por SILVA & PASCHOALATI (1992) em milho, onde suspensão de células do produto comercial e o seu filtrado reduziram o desenvolvimento do patógeno e a manifestação dos sintomas, sendo esta proteção não sistêmica e termoinstável. A antibiose também foi o mecanismo provável de ação de *S. cerevisiae* sobre *Hemileia vastatrix* em café (ROVERATTI, 1989), *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus* sp. (LOPES, 2001) e sobre *Exserohilum turcicum* em milho (STANGARLIN & PASCHOALATI, 1994). *S. cerevisiae*, *in vitro*, também afetou o desenvolvimento, reduzindo a germinação e formação de apressório por *Guignardia citricarpa* agente causal da pinta preta em citros (CARDOSO FILHO, 2003).

FIALHO (2004) constatou que o efeito inibidor do crescimento de *G. citricarpa* está associado a um composto volátil produzido por *S. cerevisiae*. CIA (2005) observou que *S. cerevisiae* protegeu fruto de mamão contra *C. gloeosporioides* e a autora atribuiu o efeito da levedura sobre o patógeno à antibiose e competição. DANTAS et al. (2004), no entanto, obtiveram resultados semelhantes usando o produto AM obtido a partir da parede celular de *S. cerevisiae*, sendo esta proteção atribuída à RSA.

Não se pode descartar, entretanto, a possibilidade da ação indireta do tratamento com filtrado de cultura sobre *C. acutatum*, uma vez que, o meio de cultura pode ter favorecido os microrganismos antagonicos, sobretudo as leveduras, presentes nas folhas do morangueiro. A adição de fontes de nutrientes tais como leite fresco e urina de vaca tem apresentado efeito sobre fitopatógenos pelo estímulo ao controle biológico natural (BETTIOL et al., 1999) e a adição de vitaminas e aminoácidos melhorou a eficácia de *Bacillus mycoides* e *Pichia guilliermondii* contra *Botrytis cinerea* em morangueiro (GUETSKY et al., 2002).

3.3.4 Efeito sobre o crescimento e a produtividade

S. cerevisiae aumentou a produtividade dos morangueiros quando aplicada por meio de preparações com suspensão de células, suspensão autoclavada de células e filtrado de cultura líquida, proporcionando com estes tratamentos uma maior massa média de frutos por planta em relação ao tratamento testemunha (Tabela 7). As doenças foliares, mancha-de-micosferela e mancha-de-dendrofoma, possivelmente, não interferiram na produtividade, pois os tratamentos que apresentaram efeito contra estas doenças não diferiram em produtividade em relação à testemunha. O melhor desempenho dos tratamentos com suspensão de células, suspensão autoclavada de células e filtrado de cultura líquida parece estar associado à capacidade destes de proteger as plantas do ataque de patógenos com preferência por tecidos de flores e frutos, como *C. acutatum*, uma vez que os tratamentos com menor incidência do patógeno proporcionaram a produção de mais frutos por planta (Tabela 6) e as menores produtividades se deram pelo menor número de frutos colhidos por planta (Tabela 7).

Mesmo em plena fase produtiva a área foliar dos morangueiros foi crescente. Durante o período de avaliação o incremento no número de folhas por planta foi de 71,5 a 77,4% conforme o tratamento, como pode ser observado na Figura 3.

Tabela 7- Produtividade de morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamento	Produtividade		
	g.fruto ⁻¹	fruto.planta ⁻¹	g.planta ⁻¹
Levedura comercial	14,9 b	35,9 abc	536,3 abc
Suspensão de células	15,4 ab	40,1 a	617,8 a
Suspensão autoclavada de células	16,0 a	37,7 abc	604,7 a
Filtrado de cultura líquida	15,1 ab	39,0 ab	589,6 ab
AM	14,9 b	34,0 c	506,7 bc
Testemunha	15,0 b	33,6 c	505,6 c
TM+F+I	15,5 ab	35,0 bc	543,7 abc
Coeficiente de Variação (%)	1,9	3,6	4,8

Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

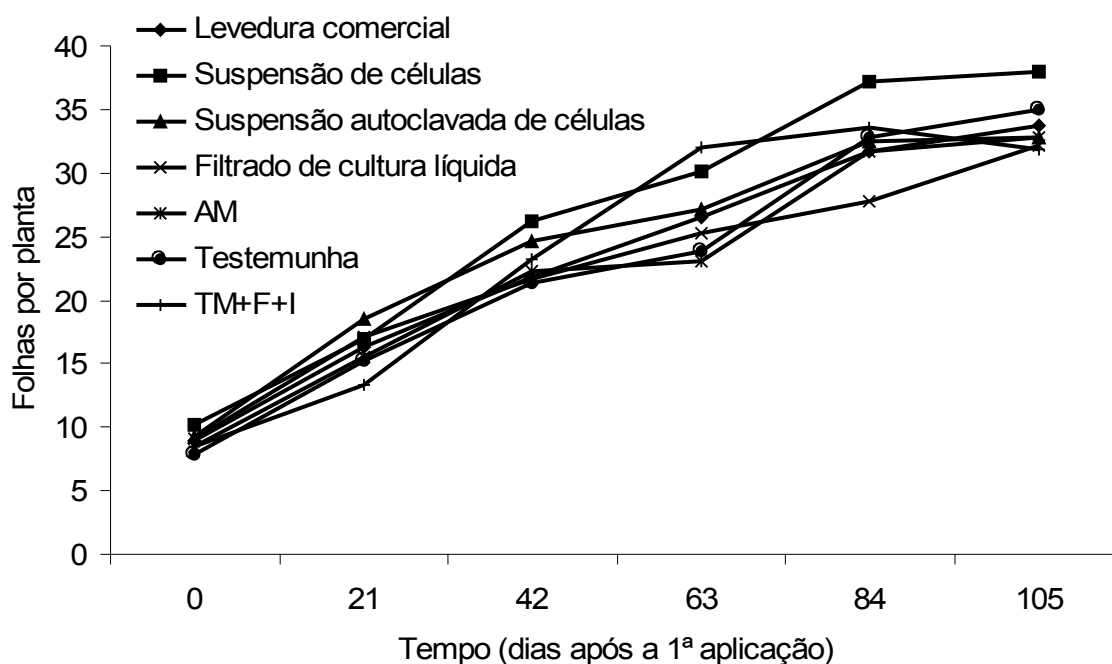


Figura 3- Número de folhas por planta de morangueiro, cultivar Camarosa, tratado com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Durante o mês de dezembro, entre as avaliações realizadas aos 84 e 105 dias após a primeira aplicação dos tratamentos houve uma estabilização geral no número de folhas, pela morte das folhas mais velhas e pela redução na emissão de novas folhas. Esta tendência se manteve até o definhamento das plantas. Os morangueiros da cultivar Camarosa conduzidos em diferentes sistemas de cultivo nos anos posteriores apresentaram comportamento diferente quanto à emissão de folhas, apresentando um número de folhas por planta menor e constante ao longo do período produtivo. Isto indica que as condições climáticas ou de cultivo, como a existência de filme de polietileno preto no solo, o cultivo em túnel baixo, a adubação, etc., do experimento realizado em 2004 tenham levado a tal comportamento.

3.3.5 Alterações bioquímicas

Além da ação por competição, os dados indicam a possibilidade de ter havido participação da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) na redução da mancha-de-dendrofoma através da indução da atividade das enzimas quitinases e β -1,3-glucanases (Tabelas 11 e 12). As proteínas relacionadas com a patogênese (PRP's) quitinases e glucanases podem ter atuado hidrolizando células fúngicas, agindo diretamente sobre o patógeno e ou liberando fragmentos oligossacarídicos do fungo ou da parede celular da planta que elicitam respostas secundárias de defesa. Vários trabalhos demonstram a redução de doenças associada ao aumento na atividade destas enzimas após indução por agentes bióticos e abióticos (GUZZO, 2003; VAN LOON et al., 2006). O tratamento com AM, sem a presença de células vivas da levedura, se destacou na indução da atividade das PRP's e apresentou um resultado semelhante aos tratamentos onde as células vivas possivelmente tenham atuado por competição, além de ter também induzido resistência na planta.

Os tratamentos provocaram mudanças bioquímicas observadas por alterações no teor de compostos do metabolismo primário no tecido foliar do morangueiro. As alterações no teor de proteínas puderam ser observadas 24 horas após a aplicação dos tratamentos com suspensão de células de *S. cerevisiae* autoclavada e fungicida. As alterações também foram perceptíveis 168 horas após a aplicação dos tratamentos com suspensão autoclavada de células e AM em relação à testemunha (Tabela 8). O aumento no teor de proteína está, possivelmente, relacionado com o aumento da atividade das enzimas relacionadas com a patogenicidade, como quitinases ou glucanases, também observado nesta data de coleta. Os teores de proteína não diferiram entre si ao longo do período de avaliação nos

tratamentos com filtrado de cultura líquida e TM. Nos morangueiros tratados com suspensão de células vivas, autoclavadas e AM, no entanto, houve uma maior concentração de proteínas 168 horas após a aplicação dos tratamentos.

Os morangueiros tratados com suspensão de células vivas, autoclavadas, AM e TM apresentaram uma concentração mais elevada de açúcares totais na avaliação realizada 24 horas após a aplicação dos tratamentos (Tabela 9). Semelhantemente ao observado na avaliação das proteínas, os tratamentos que promoveram teores mais elevados de açúcar também apresentaram maior atividade das enzimas quitinases e ou glucanases, indicando uma aceleração do metabolismo primário em função do estímulo proporcionado pelos elicitores.

Tabela 8- Concentração de proteínas solúveis em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa após o tratamento com diferentes formas de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2005.

Tratamentos	Concentração de proteínas solúveis (mg.g ⁻¹)				C.V.
	Tempo após a aplicação (horas)				
	24	72	120	168	(%)
Suspensão de células	3,21 abAB	2,33 bAB	1,88 aB	4,75 abcA	26,2
Susp. autoclavada de cél.	4,22 aAB	2,68 bB	3,94 aAB	5,15 abA	17,6
Filtrado de cultura líquida	2,22 abA	2,61 bA	2,48 aA	4,39 abcA	22,4
AM	3,40 abAB	2,52 bB	2,34 aB	5,21 aA	27,6
Testemunha	2,01 bB	5,35 aA	2,39 aB	2,80 cB	22,0
TM	4,25 aA	2,74 bA	3,19 aA	3,08 bcA	16,7
C.V. (%)	20,9	21,6	29,1	16,4	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$). AM = Agro-MOS®; TM = clorotalonil+tiofanato-metílico.

Também a exemplo do que foi observado nas avaliações de proteína as maiores oscilações nos teores de açúcar foram observadas na avaliação realizada 24 horas após a aplicação dos tratamentos, indicando que o impacto da ativação dos mecanismos de resistência pelos indutores sobre o metabolismo primário ocorreu nos primeiros dias após a aplicação.

Nos tratamentos que provocaram aumento na concentração de açúcar, agora de modo contrário ao observado na avaliação de proteína, o teores mais elevados foram observados na avaliação inicial, feita 24 horas após a aplicação dos tratamentos, indicando um desvio de carbono na forma de açúcar para o metabolismo secundário, em função da

ativação dos mecanismos de resistência, possivelmente a rota dos fenilpropanóides, com formação do ácido benzóico, precursor do ácido salicílico, que por sua vez, está envolvido na cascata de sinais que leva a formação das enzimas relacionadas com a patogenicidade, tais como quitinases e glucanases (Tabelas 11 e 12).

Tabela 9- Concentração de açúcares totais em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa, após o tratamento com diferentes formas de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2005.

Tratamentos	Concentração de açúcares totais (mg.g ⁻¹)				C.V. (%)
	Tempo após a aplicação (horas)				
	24	72	120	168	
Suspensão de células	42,8 aA	31,4 aA	26,5 aA	30,2 abA	19,1
Susp. autoclavada de cél.	45,6 aA	29,4 aB	27,7 aB	35,3 aAB	12,0
Filtrado de cultura líquida	23,4 bA	30,9 aA	34,6 aA	31,3 abA	21,3
AM	40,2 aA	26,8 aAB	22,4 aB	28,4 abAB	16,8
Testemunha	19,1 bB	35,1 aA	31,6 aAB	29,8 abAB	15,8
TM	38,3 aA	22,1 aAB	32,5 aAB	20,1 bB	16,9
C.V. (%)	14,5	16,6	18,2	14,3	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$). AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico.

A concentração de açúcares redutores apresentou variações apenas na avaliação feita 168 horas após a aplicação dos tratamentos, quando as plantas tratadas com suspensão autoclavada de células apresentou maior concentração em relação aos demais tratamentos (Tabela 10).

Quanto à capacidade de ativar mecanismos de resistência em morangueiro, exceto o tratamento com filtrado de cultura, as preparações de *S. cerevisiae* induziram o aumento da atividade das enzimas quitinases e ou β -1,3-glucanases (Tabelas 11 e 12). As preparações de *S. cerevisiae* induziram o aumento da atividade das enzimas em momentos diferentes e este aumento não perdurou por muito tempo. Em 120 horas após os tratamentos não houve mais diferença entre os tratamentos quanto à atividade de quitinases. Com relação a β -1,3-glucanases, 168 horas após a aplicação, os tratamentos que induziram o aumento da atividade desta enzima apresentaram resultados inferiores à testemunha. Isto ocorre, provavelmente, porque a planta além de deixar de expressar resistência, dada a não continuidade do estímulo para síntese da proteína lítica, seja pelo elicitador ou pela presença

de um processo infeccioso por um patógeno, pode também ativar mecanismo para degradar a enzima, uma vez que esta se torna desnecessária no tecido vegetal.

Tabela 10- Concentração de açúcares redutores em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa, após o tratamento com diferentes formas de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2005.

Tratamentos	Concentração de açúcares redutores (mg.g ⁻¹)				C.V.
	Tempo após a aplicação (horas)				
	24	72	120	168	(%)
Suspensão de células	0,088 aA	0,098 aA	0,068 aA	0,077 bA	13,5
Susp. autoclavada de cél.	0,087 aAB	0,070 aB	0,075 aB	0,117 aA	10,3
Filtrado de cultura líquida	0,077 aA	0,089 aA	0,070 aA	0,075 bA	14,1
AM	0,080 aA	0,071 aA	0,056 aA	0,060 bA	12,0
Testemunha	0,064 aA	0,100 aA	0,069 aA	0,075 bA	33,6
TM	0,076 aA	0,073 aA	0,073 aA	0,081 bA	13,7
C.V. (%)	12,7	13,4	13,6	13,8	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$). AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico.

Tabela 11- Atividade de quitinases em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa, após o tratamento com diferentes formas de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2005.

Tratamentos	Atividade de quitinases (UAbs.min ⁻¹ .g proteína ⁻¹)				C.V. (%)
	Tempo após a aplicação (horas)				
	24	72	120	168	
Suspensão de células	2,0 bcA	2,7 abA	4,2 aA	2,7 aA	40,4
Susp. autoclavada de cél.	3,9 abcA	2,1 bA	1,1 aA	2,3 aA	24,0
Filtrado de cultura líquida	2,3 bcA	2,1 bAB	2,5 aAB	1,6 aB	28,5
AM	6,9 aA	5,3 aA	3,9 aA	2,2 aA	37,6
Testemunha	1,2 cA	1,4 bB	3,4 aAB	2,4 aB	35,0
TM	4,6 abB	3,0 abA	2,2 aAB	2,6 aAB	22,7
C.V. (%)	31,1	28,6	39,3	22,7	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$). AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico.

O tratamento com AM apresentou os melhores resultados na indução das enzimas, devido, provavelmente, ao maior contato do composto elicitador presente em *S. cerevisiae* facilitado pelo processo por que passa a levedura para obtenção do produto comercial. O

produto também aumentou a atividade de β -1,3-glucanases em mamão induzindo resistência no tecido do fruto contra podridão provocada por *C. gloeosporioides* (DANTAS et al., 2004).

Comparando-se a atividade de β -1,3-glucanases entre os tratamentos com suspensão autoclavada de células ou não, observa-se que o tratamento com células não autoclavadas induziu o aumento da atividade da enzima nas avaliações feitas 24 e 120 h após a aplicação, enquanto que o tratamento com células autoclavadas apenas 24 h. Comportamento semelhante foi obtido por RONCATTO & PASCHOLATI (1998), que avaliando diferentes preparações de *S. cerevisiae* observaram que a suspensão autoclavada de células aumentou mais rapidamente a atividade da enzima peroxidase em relação à suspensão não autoclavada.

Tabela 12- Atividade de glucanases em tecido foliar de morangueiro, cultivar Camarosa, após o tratamento com diferentes formas de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2005.

Tratamentos	Atividade de glucanases (UAbs.min ⁻¹ .g proteína ⁻¹)				C.V.
	Tempo após a aplicação (horas)				
	24	72	120	168	(%)
Suspensão de células	3,2 aA	0,9 cB	8,8 aA	0,2 cB	36,0
Susp. autoclavada de cél.	4,8 aA	1,6 bcAB	1,9 bAB	0,4 cB	42,0
Filtrado de cultura líquida	0,8 bA	4,3 abA	3,3 bA	2,8 abA	25,9
AM	3,5 aB	7,3 aA	2,4 bAB	1,7 bAB	59,3
Testemunha	0,1 bA	1,9 abcA	2,2 bA	4,0 aA	33,1
TM	1,9 abB	3,3 abcA	2,3 bA	2,1 bA	27,2
C.V. (%)	47,1	40,8	46,3	26,8	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$). AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico.

A capacidade de *S. cerevisiae* induzir resistência sistêmica em plantas está associada a determinados carboidratos e glicoproteínas presentes na parede celular, sendo que a autoclavagem promove uma maior extração, particularmente, de carboidratos sem afetar sua capacidade elicitora (WULFF & PASCHOLATTI, 1998; BONALDO, 2005). Assim, o aumento mais rápido na atividade de β -1,3-glucanases induzido pelo tratamento com suspensão autoclavada de células se deu, possivelmente, pelo contato mais rápido do elicitor liberado no processo de autoclavagem, fazendo com que este seja mais rapidamente reconhecido pelo tecido vegetal, enquanto que no tratamento com suspensão não

autoclavada o elicitor foi liberado mais tardiamente, na medida em que as células da levedura iam se deteriorando.

3.4 CONCLUSÕES

Nenhuma das preparações de *S. cerevisiae* apresentou efeito duradouro contra a mancha-de-micosferela causada por *Mycosphaerella fragariae* ;

As preparações de *S. cerevisiae* com presença de células vivas e o produto comercial produzido a partir de parede celular da levedura, Agro-MOS®, apresentaram efeito contra mancha-de-dendrofoma causada por *Dendrophoma obscurans*;

As preparações de *S. cerevisiae* com suspensão do produto comercial e filtrado de cultura líquida reduziram a incidência de flor preta causada por *Colletotrichum acutatum* em flores e frutos;

As preparações de *S. cerevisiae* com suspensão de células, suspensão autoclavada de células e filtrado de cultura líquida promoveram aumento na produtividade dos morangueiros;

As preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, com presença de células vivas ou não, alteraram o metabolismo do morangueiro aumentando a atividade de enzimas envolvidas na resistência sistêmica adquirida quitinases e glucanases.

3.5 REFERÊNCIAS

BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B. D.; LUIZ, A. J. B. Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. **Crop Protection**, Guildford, v.18, n.8, p.489-492, 1999.

BONALDO, S. M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. Piracicaba, 2005. 150p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry**, Orlando, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

CARDOSO FILHO, J. A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-S-Metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*).** Piracicaba, 2003. 126p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CHEAH, L. H.; MARSHALL, A. P. Biological control of Fusarium storage rot of squash with yeasts. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 48., 1995, Hastings. **Anais.** Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1995. p.337-339.

CHEAH, L. H.; TRAN, T. B. Postharvest biocontrol of Penicillium rot of lemons with industrial yeasts. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 48., 1995, Hastings. **Anais.** Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1995. p.155-157.

CHEAH, L.H.; HUNT, A.W. Screening of industrial yeasts for biocontrol of Botrytis storage rot in kiwifruit. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 47., 1994, Waitangi. **Anais.** Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1994. p.362-363.

CIA, P. 2005. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*).** Piracicaba, 2005. 197p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p.314-319, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.28, p.350-356, 1956.

EMBRAPA. **Mapa de reconhecimento de solos do Paraná.** Curitiba, 1984. 1 mapa: color.; 66 x 80 cm. Escala 1:1.000.000.

FERNANDES-JÚNIOR, F.; FURLANI, P. R.; RIBEIRO, I. J. A.; CARVALHO, C. R. L. Produção de frutos e estolhos do morangueiro em diferentes sistemas de cultivo em ambiente protegido. **Bragantia**, Campinas, v.61, n.1, p.25-34, 2002.

FIALHO, M. B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. Piracicaba, 2004. 60p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

GUETSKY, R.; ELAD, Y.; SHTIENBERG, D.; DINOOR, A. Improved biocontrol of *Botrytis cinerea* on detached strawberry leaves by adding nutritional supplements to a mixture of *Pichia guilhermondii* and *Bacillus mycoides*. **Biocontrol Science and Technology**. Lethbridge, v.12, n.5, p.625-630, 2002.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.144, n.9/10, p.449-454, 1996.

GUZZO, S. D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.11, p.283-332, 2003.

LOPES, E. A. G. L. **Controle biológico de *Botrytis cinerea* *in vitro* e em mudas de *Eucalyptus* sp.** Lavras. 2001. 45p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.1, p.5-9, 2005.

REICHERT, L. J.; MADAIL, J. C. M. Aspectos Socioeconômicos. In: SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A.R.M. (Ed.). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.12-15. (Frutas do Brasil, 40).

RONCATTO, M. C.; PASCHOLATI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.3, p.395-402, 1998.

ROVERATTI, D. S. **Proteção de plantas de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk, et Br, por *Saccharomyces cerevisiae***. Piracicaba, 1989. 93p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. Nutrição, calagem e adubação. In: SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. (Ed.). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p.39-45. (Frutas do Brasil, 40).

SILVA, S. R. da; PASCHOLATI, S. F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v.99, n.2, p.159-167, 1992.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.20, p.16-21, 1994.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F.; LABATE, C. A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.25, n. 1, p.59-66, 2000.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. Fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.5, p.484-488, 2002.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A.; BETTI, J. A. Resistência de *Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum* ao benomyl na cultura do morango no estado de São Paulo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.54, n.3, p.139-146, 1997.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants . **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.44, p.135-162, 2006.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Micro-plate colorimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, n.5, p.511-519, 1992.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.1, p.138-143, 1998.

4 CAPÍTULO II - QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE MORANGO TRATADO EM PRÉ-COLHEITA COM *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade pós-colheita de morangos tratados em pré-colheita com diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*. O trabalho foi realizado na UTFPR-Campus Dois Vizinhos em 2004 com a implantação de um experimento com delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições, utilizando-se 16 plantas por parcela de onde foram retirados os frutos para as análises pós-colheita. Utilizou-se a cultivar Camarosa conduzida em sistema de túnel baixo com irrigação localizada. Os tratamentos consistiram na pulverização semanal de cinco diferentes preparados a partir da levedura *S. cerevisiae*, suspensão com fermento biológico fresco comercial, suspensão de células de levedura, suspensão autoclavada de células, filtrado de cultura em meio líquido e Agro-MOS®, um produto comercial formulada a partir da levedura, além da testemunha com água destilada e do tratamento controle com fungicidas. Acondicionou-se em bandejas 10 frutos colhidos em cada repetição, que foram mantidos em temperatura ambiente por cinco dias para posterior avaliação. Para as análises físico-químicas e fisiológicas em pós-colheita determinou-se a incidência de podridão, firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis totais, taxa respiratória e produção de etileno. Os tratamentos com as preparações de *S. cerevisiae* não interferiram nos parâmetros firmeza de polpa e acidez, no entanto, pode-se constatar uma menor taxa respiratória em frutos tratados com levedura comercial, uma menor produção de etileno e um maior teor de sólidos solúveis totais em frutos tratados com levedura comercial, filtrado de cultura líquida e Agro-MOS®. Todos os tratamentos, com exceção do tratamento com suspensão autoclavada de células, reduziram em até 36% a incidência de mofo-cinzento em pós-colheita de frutos. Os resultados indicam que *S. cerevisiae* é um potencial agente de biocontrole, devendo ser conduzidos outros estudos com a levedura, inclusive em associação com outras alternativas, no controle de doenças no morangueiro.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa*, antibiose, antagonismo, *Botrytis cinerea*

POST-HARVEST QUALITY OF STRAWBERRY FRUITS TREATED IN PRE-HARVEST WITH *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

The present work had the objective of evaluating the post-harvest quality of strawberry fruits treated in pre-harvest with different preparations of the *Saccharomyces cerevisiae*. This work was carried out in 2004 and 2005 at Federal University of Technology - Parana, *Campus* Dois Vizinhos - PR. The experimental design used was a randomized block with four replications containing 16 plants each. The treatment consisted of a weekly spraying of five different preparations of the yeast *S. cerevisiae*, suspension of the commercial available fresh biological yeast, suspension of the yeast cells, suspension of the autoclaved cells, filtered of culture in liquid medium and Agro-MOS[®], and control treatments, with water spraying and another one with fungicides. The treatments with the preparations of *S. cerevisiae* had not intervened with the parameters flesh firmness and titratable acidity, however, it can be evidenced lesser respiration rate in fruits treated with commercial yeast, lesser ethylene production and a bigger total soluble solids concentration in fruits treated with commercial yeast, filtered of liquid culture and Agro-MOS[®]. Except for the treatment with suspension of autoclaved cells, the other preparations, suspension of cells, suspension with commercial product, filtered of liquid culture and Agro-MOS[®] reduced in up to 36% the incidence of gray mould (*Botrytis cinerea* Pers. (1794)) in the post-harvest of fruits. The results indicate that *S. cerevisiae* is a potential agent for biocontrol of diseases. Further studies have to be lead with the yeast, including the association with other alternatives to control the diseases in strawberry plants.

keywords: *Fragaria x ananassa*, antibiosis, antagonism, *Botrytis cinerea*

4.1 INTRODUÇÃO

A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) vem se constituindo nos últimos anos em uma importante fonte de renda e uma alternativa para pequenas propriedades. No entanto, o desenvolvimento da cultura tem encontrado um dos seus maiores entraves na fase da comercialização, sobretudo a grandes distâncias, pela alta perecibilidade dos frutos (BRACKMANN et al., 1999).

O morango é considerado uma fruta não climatérica sendo de difícil conservação devido à sua rápida degradação pela intensa atividade metabólica e grande suscetibilidade

ao ataque de patógenos (BRACKMANN et al., 2001). Entre as doenças causadoras de deterioração na cultura o mofo-cinza dos frutos, causado por *Botrytis cinerea* Pers. é a maior causa de perda de frutos no mundo (BOFF et al., 2003; SCHMID et al., 2005; SANSONE et al., 2005). Sob condições favoráveis, durante a floração e a colheita, as perdas no campo podem exceder 50% (BLANCO et al., 2006) e do total de frutos comercializados as perdas por podridões podem chegar a níveis de 20 a 40% em poucos dias (BRACKMANN et al., 2001).

As medidas de controle comumente empregadas envolvem a aplicação de agrotóxicos, no entanto o mofo-cinza não é controlado satisfatoriamente com fungicidas, uma vez que, por sua variabilidade genética o fungo desenvolveu resistência a muitos dos produtos químicos introduzidos nos últimos 20 anos (HELBIG, 2001; SANSONE et al., 2005). Isto aliado a crescente conscientização da população em geral sobre os malefícios desta prática ao ecossistema e a saúde humana tem sustentado a busca de alternativas (TIAN et al., 2006; BATTA, 2007). O controle biológico vem sendo apontado como alternativa aos fungicidas e neste contexto as leveduras, por serem isentas de substâncias tóxicas e possuírem múltiplos modos de ação antagonista são os organismos que melhor preenchem requisitos para esta finalidade (LEVY et al., 2000; PUNJA & UTKHEDE, 2003; WSZELAKI & MITCHAM, 2003).

Dentre as leveduras *S. cerevisiae* tem-se destacado por apresentar resultados positivos no controle de vários patógenos, como *Fusarium sambucium* em abobrinha (*Curcubita maxima*) (CHEAH & MARSHALL, 1995), de *Penicillium digitatum* em limão (CHEAH & TRAN, 1995) e de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão (DANTAS et al., 2004; CIA, 2005). Em testes preliminares foi demonstrado que *S. cerevisiae* é um agente promissor no controle dos contaminantes oportunistas como *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus candidus* (PETERSSON & SCHNÜRER, 1995) e da podridão causada por *Penicillium* spp. em maçã (LEVY et al., 2000).

S. cerevisiae mostrou-se efetiva no controle de *B. cinerea* em frutos de kiwi (CHEAH & HUNT, 1994) e em folhas de mudas de *Eucalyptus* sp. (LOPES, 2001), não havendo, contudo, informação sobre o efeito da levedura sobre patógenos no morango. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes preparados a partir de *S. cerevisiae* aplicados em pré-colheita sobre a qualidade pós-colheita, incidência de podridões, firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis totais, taxa respiratória e produção de etileno de frutos de morangueiro.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Delineamento experimental e implantação do experimento

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Dois Vizinhos, situada a 25°, 42', 52" S e 53°, 03', 94" W, a 519 metros acima do nível do mar. O solo local é do tipo Latossolo Vermelho Distroférrico Típico (EMBRAPA, 1984) e o terreno apresenta em torno de 3% de declividade média .

Trinta dias antes do plantio previsto foi aplicado calcário com base no resultado da análise química do solo e posteriormente incorporado. O experimento foi implantado em maio de 2004, utilizando-se o delineamento experimental blocos ao acaso com quatro repetições, com parcelas de 1,20 m X 1,20 m composta por 16 plantas, espaçadas 0,30 m uma das outras, formando quatro fileiras de quatro plantas. Foi utilizada a cultivar Camarosa, em sistema de túnel baixo com irrigação por gotejamento. Foi colocada uma cobertura no solo com filme de polietileno preto 30 dias após plantio. A adubação de base foi realizada por ocasião do plantio e após a colocação da cobertura por fertirrigação com base na recomendação para a cultura.

O início dos tratamentos com a aplicação dos elicitores se deu aos 45 dias após o plantio. As aplicações foram repetidas a cada sete dias até o final do ciclo da cultura, perfazendo um total de 25, sendo o volume de calda usado nos tratamentos e de água destilada no tratamento testemunha em média de 30 mL por planta.

Os frutos oriundos do experimento descrito anteriormente foram avaliados quanto ao efeito dos tratamentos realizados em pré-colheita na qualidade em pós-colheita. Os morangos foram colhidos em embalagens identificadas conforme os tratamentos e no laboratório, contados e selecionados, eliminando-se aqueles fora do padrão do ponto de maturação ou com ferimentos, sendo, em seguida, acondicionados em bandejas e mantidos em temperatura ambiente por cinco dias e, posteriormente, efetuaram-se as avaliações físico-químicas pós-colheita. As avaliações foram realizadas com quatro repetições e a unidade experimental composta por 10 frutos.

Os ensaios foram realizados duas vezes, sendo que na segunda os frutos foram artificialmente feridos em dois lugares. Os ferimentos situavam-se em lados opostos na região equatorial dos frutos e possuíam 2 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade. As análises físico-químicas dos frutos, incidência de podridões, firmeza de polpa e acidez titulável foram realizadas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Campus* Dois Vizinhos – PR. A seqüência das avaliações se deu conforme o cronograma de atividades apresentado no Quadro 5.

4.2.2 Obtenção dos tratamentos

Os tratamentos consistiram na pulverização semanal da levedura *S. cerevisiae* em cinco diferentes preparações, sendo T1 - suspensão com fermento biológico fresco comercial (30 mg.mL^{-1}); T2 - suspensão de células de levedura ($1 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$); T3 - suspensão autoclavada de células ($1 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$); T4 - filtrado de cultura em meio líquido ($0,1 \text{ mL.mL}^{-1}$); T5 – Agro-MOS® (AM), um produto formulado a partir da levedura, relatado como indutor de resistência a doenças em plantas (DANTAS et al., 2004) ($0,002 \text{ mL.mL}^{-1}$); T6 - testemunha (água); e T7 – controle (TM+F+I, clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione), que consistiu na aplicação de uma combinação de fungicidas a cada sete dias com uso de clorotalonil+tiofanato-metílico ($0,049 \text{ g.L}^{-1}$) até o florescimento e posteriormente alternou-se folpete ($0,0135 \text{ g.L}^{-1}$) e Iprodione ($0,075 \text{ g.L}^{-1}$).

As suspensões com fermento biológico fresco (T1) foram obtidas a partir do produto comercial Itaiquara® adquirido no comércio local semanalmente. As preparações de *S. cerevisiae* (T2 e T3) foram obtidas de isolamento a partir do produto comercial e posteriormente cultivada em meio YEPG: 10 g de extrato de levedura; 20 g de peptona; 20 g de glicose; 20 g de ágar; e 1000 mL de água. Semanalmente, a levedura foi repicada para placas de Petri com o meio e mantidas a 26°C por 48 h. Posteriormente, as células foram suspensas em água destilada e a concentração ajustada em $1 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$ com uso de câmara de Neubauer, sendo que parte da suspensão, destinado ao T3, foi autoclavada a 120°C por 20 min.

Para obtenção do filtrado (T4) a levedura foi cultivada em estufa a 26°C sob agitação orbital (90 rpm) por 48 h em meio YEPG líquido. O material resultante foi esterilizado através de filtração em membrana de nitrocelulose com diâmetro de poro de $0,2 \mu\text{m}$ e posteriormente diluído em água.

4.2.3 Avaliação da incidência de mofo cinzento

A avaliação da incidência de podridões foi realizada pela análise visual e expressa em percentual de frutas com sintomas de podridão por *B. cinerea*, sendo consideradas podres aquelas que apresentavam sintomas e sinais típicos de ataque do patógeno.

4.2.4 Avaliação físico-química em pós-colheita

A firmeza de polpa foi determinada com uso de penetrômetro manual de alta precisão com leitura de 0 a 14 libras, munido de uma ponteira de 7,9 mm, perfurando-se

cada fruta em dois lados opostos na região equatorial. O valor foi expresso em libras/cm² e transformado para Newton.

A acidez titulável foi determinada em uma amostra de 10 mL de suco dos frutos diluída em 100 mL de água destilada e titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1N até pH 8,1. O resultado expresso em meq.100mL⁻¹.

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado por refratometria manual, com posterior correção do efeito da temperatura e o resultado expresso em °Brix.

4.2.5 Avaliações fisiológicas

Para as avaliações fisiológicas os frutos de uma colheita, conforme Quadro 5, de todos os tratamentos, foram transportados para o Núcleo de Pesquisa em Pós-colheita (NPP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - Santa Maria - RS, iniciando as avaliações aproximadamente 12 h após a colheita.

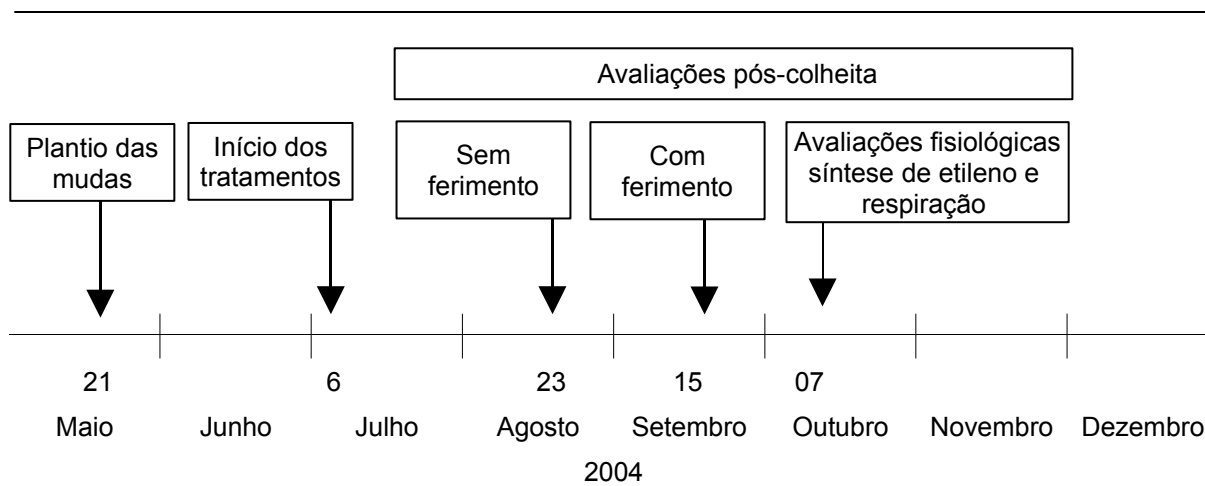
Síntese de etileno - na análise da síntese de etileno, uma amostra de 25 frutos foi acondicionada em recipientes de 5 L, hermeticamente fechados durante duas horas, a 20 °C. Após esse período, com uma seringa de plástico de 1 mL, foram coletadas duas amostras da atmosfera do espaço livre desses recipientes, que foram imediatamente injetadas em um cromatógrafo a gás, marca Varian[□], modelo 3400, equipado com uma coluna de aço inox 1/8" de 0,70 m de comprimento, preparada com Porapak N80/100 e um detector de ionização de chama, com N₂ como gás de arraste. As temperaturas da câmara de injeção, coluna e detector foram: 90 °C, 140 °C e 200 °C, respectivamente. O cromatógrafo foi acoplado a um microcomputador com software de curva de calibração, que fornecia os resultados em mL.L⁻¹. Por meio da concentração de etileno, da massa dos frutos, do volume do espaço livre no recipiente e do tempo, foi calculada a produção de etileno em mL.kg⁻¹.h⁻¹.

Respiração - a respiração foi determinada pela produção de CO₂ pelos frutos. O ar do espaço livre do recipiente utilizado para determinação da síntese de etileno foi circulado através de um analisador eletrônico de CO₂, marca Agri-Datalog[□], e por meio da concentração de CO₂, do volume do espaço livre, da massa dos frutos e do tempo de fechamento, foi calculada a respiração em mLCO₂.kg⁻¹.h⁻¹.

4.2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à avaliação de homogeneidade pelo teste de Bartlett a 5% de probabilidade de erro. As médias não homogêneas foram transformados por \sqrt{x} e os valores expressos em percentual por $\text{arc.sen } \sqrt{x/100}$ e, posteriormente, submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro, com a utilização do software SASM Agri.

Quadro 5 - Cronograma das atividades desenvolvidas visando avaliar os parâmetros pós-colheita acidez titulável, firmeza de polpa, sólidos solúveis totais, síntese de etileno, respiração e incidência de mofo-cinzeno (*Botrytis cinerea*) em frutos de morangueiro, cultivar Camarosa, após tratamento em pré-colheita com *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.



4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito contra o mofo-cinzeno e alterações físico-químicas

Todos os tratamentos com preparações de *S. cerevisiae*, exceto o tratamento com suspensão autoclavada de células, tiveram efeito sobre a podridão provocada por *B. cinerea*, proporcionando uma incidência de mofo-cinzeno inferior ao tratamento testemunha e comparáveis ao tratamento com fungicidas. O tratamento com filtrado de cultura líquida reduziu 64,1% e o tratamento com AM 50,2% a incidência de podridões nos frutos em relação à testemunha (Tabela 13).

No ensaio posterior, onde se avaliou o efeito dos tratamentos realizados na pré-colheita sobre os parâmetros pós-colheita, com ferimentos artificiais nos frutos, constatou-se que nenhum dos tratamentos apresentou efeito sobre o mofo-cinzento (Tabela 13). Estes resultados demonstram a importância do cuidado durante a colheita, evitando-se danos mecânicos nos frutos.

Tabela 13– Incidência de mofo-cinzento (*Botrytis cinerea*) em frutos de morango da cultivar Camarosa, tratado em pré-colheita com diferentes formas de *Saccharomyces cerevisiae*, sem inoculação, inoculado com *B. cinerea* e feridos artificialmente em pós-colheita, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamentos	Incidência de podridão por <i>Botrytis cinerea</i> (%)	
	Sem ferimento	Com ferimento
Levedura comercial	26,8 bc	80,0 ^{ns}
Suspensão de células	26,0 bc	75,0
Suspensão autoclavada de células	32,0 ab	80,0
Filtrado de cultura líquida	16,8 c	75,0
AM	23,3 bc	73,9
Testemunha	46,8 a	60,0
TM+F+I	24,0 bc	67,5
Coeficiente de Variação (%)	19,7	20,6

Médias seguidas de mesmas letras ou “ns” nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil+tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

Estes resultados também indicam que a qualidade dos morangos na pós-colheita depende das condições de manejo da cultura e que os tratamentos com *S. cerevisiae* bem como o controle com fungicidas possivelmente atuaram sobre *B. cinerea* ainda no campo reduzindo a quantidade de inóculo e a infecção de flores e frutos. Reforçando a teoria de LIMA et al. (1997) que obtiveram melhores resultados através da menor incidência de podridão por *B. cinerea* com a aplicação das leveduras *Aureobasidium pullulans* e *Candida oleophila* em morangueiro na fase de floração em relação aos tratamentos feitos em frutos maduros em pré-colheita e pós-colheita. Os autores propuseram que a maioria de podridões provocadas por *B. cinerea* em morango começam nas peças florais senescentes infectadas, que conduzem às infecções latentes que se tornam mais tarde podridões ativas em frutas maduras.

A importância das peças florais no desenvolvimento do mofo-cinzento dos frutos do morangueiro foi comprovada por BOFF et al. (2003), que constataram a presença de *B.*

cinerea em até 85% das pétalas e estames e em até 100% das flores. Os autores constataram que a remoção das pétalas no final da floração reduziu em até 55% a incidência da doenças nos frutos. A menor incidência de *B. cinerea* em morangos no período pós-colheita também foi obtido por HELBIG (2002) com a aplicação da levedura *Cryptococcus albidus* no florescimento. A aplicação do produto comercial Saccharopulvin 25 formulado a partir da levedura *Saccharomyces chevalieri* nas fases do fim do florescimento, queda de pétala, formação da baga, fechamento do cacho e três semanas antes da colheita por três safras de uva, reduziu em média 91% da incidência de podridão no cacho por *B. cinerea* (SESAN et al., 1999⁴ apud ELMER & REGLINSKI, 2006).

Os tratamentos não apresentaram diferença entre si quando avaliados quanto aos parâmetros firmeza de polpa e acidez (Tabela 14).

Tabela 14- Parâmetros pós-colheita de frutos de morango, cultivar Camarosa, tratado em pré-colheita com diferentes formas de *Saccharomyces cerevisiae*, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil, 2004.

Tratamentos	Respiração (mLCO ₂ .Kg ⁻¹ .h ⁻¹)	Etileno (μLC ² H ⁴ .Kg ⁻¹ .h ⁻¹)	Firmeza * (N.cm ⁻²)	SST * (° Brix)	Acidez * (meq. 100mL ⁻¹)
Levedura comercial	29,8 b	0,07 b	1,75 ^{ns}	7,2 a	6,8 ^{ns}
Suspensão de células	41,5 a	0,11 ab	1,66	6,8 ab	7,5
Susp. autoclavada de cél.	41,2 a	0,14 ab	1,86	6,7 b	7,2
Filtrado de cultura líquida	38,4 ab	0,07 b	1,69	6,6 b	5,8
AM	37,9 ab	0,10 b	2,26	7,2 a	6,7
Testemunha	42,7 a	0,22 a	2,07	6,0 c	6,2
TM+F+I	40,3 ab	0,15 ab	1,67	6,0 c	6,4
Coefic. de Variação (%)	17,3	15,9	10,57	1,8	7,5

Médias seguidas de mesmas letras ou "ns" nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan. * = dados referentes ao experimento para avaliar a incidência de mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* em frutos de morango, cultivar Camarosa, tratado em pré-colheita com diferentes formas de *Saccharomyces cerevisiae*, sem inoculação e sem fermento (Tabela 13). SST = Sólidos solúveis totais. AM = Agro-MOS®; TM+F+I = clorotalonil +tiofanato-metílico, folpete e Iprodione.

Os tratamentos com preparações de *S. cerevisiae* apresentaram maiores teores de sólidos solúveis totais que os tratamentos testemunha, corroborando os resultados obtidos na avaliação de podridão, uma vez que, a maior incidência de podridão na testemunha,

4 SESAN, T.; OPREA, M.; CRISTESCU, A. P.; TICA, C.; OANCEA, F. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccharomyces chevalieri*. **Bulletin of the Polish Academy of Biological Sciences**, v.47, n.2-4, 197-205, 1999.

possivelmente acarretou na aceleração do metabolismo nos frutos e em consequência uma maior degradação do açúcar.

No ensaio realizado para avaliar a respiração e a produção de etileno o tratamento testemunha apresentou maior produção de etileno nos frutos em relação aos tratamentos com preparações de *S. cerevisiae*, reafirmando a possibilidade da aceleração do metabolismo decorrente da maior incidência de podridão (Tabela 14). No que diz respeito à respiração, contudo, só foi possível detectar diferença entre o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* a partir da levedura comercial e o tratamento testemunha onde foi constatada a maior respiração (Tabela 14).

4.3.2 Modo de ação de *Saccharomyces cerevisiae*

O fato de que diferentes preparações a partir de *S. cerevisiae* apresentaram efeito sobre a podridão causada por *B. cinerea* em morango indica que a levedura pode atuar por diferentes mecanismos neste patossistema.

O efeito antagônico com o uso de células vivas de *S. cerevisiae* sobre *B. cinerea* já é conhecido através de trabalhos como o realizado *in vitro* por WALKER et al., (1995) e sobre folhas de *Eucalyptus* por LOPES (2001). Também é conhecida, por meio do trabalho realizado por REGLINSKI et al. (1995), a incapacidade de células mortas da levedura afetarem o patógeno. Contudo, aplicadas nas folhas de alface levou o vegetal a apresentar menores danos por *B. cinerea*.

A ineficácia do tratamento com suspensão de células de *S. cerevisiae* autoclavadas pode indicar a possibilidade de ter havido efeito do processo de autoclavagem em pelo menos dois modos de ação, a competição, obviamente pela morte das células da levedura e a antibiose pela inativação de um metabólito ou complexo de metabólitos com ação tóxica sobre o patógeno, ressaltando a importância destes mecanismos de ação na preparações com efeito positivo. SILVA (1989) observou que o tratamento térmico de *S. cerevisiae* anulou a capacidade da levedura interferir no desenvolvimento de *C. graminicola* em milho. Por outro lado, o processo de autoclavagem melhora a capacidade de induzir resistência, pela liberação de moléculas elicitoras, tais como as mananas, presentes na parede celular da levedura (WULFF & PASCHOLATI, 1998; LABANCA, 2002).

Vários trabalhos evidenciaram que os nutrientes exógenos dos tecidos de planta, tais como das pétalas senescentes e grãos de pólen, são requeridos para o germinação dos conídios, o subsequente crescimento e desenvolvimento do tubo germinativo e hifa de *B. cinerea*, e para a infecção de plantas hospedeiras por este fungo (LI et al., 2002). Assim a

competição por nutriente pode ter sido um importante modo da ação de *S. cerevisiae* sobre *B. cinerea*.

Em morangueiros cultivados em sistema de túneis plásticos os tratamentos com as leveduras *Aureobasidium pullulans* e *Candida oleophila* aplicadas no florescimento, em frutos maduros pré-colheita e em pós-colheita, LIMA et al. (1997) observaram menor incidência de podridão causada por *B. cinerea* após sete dias de armazenamento a 3 °C. Em ensaio *in vitro* as leveduras inibiram o crescimento micelial de *B. cinerea* e reduziram a germinação dos conídios em meio com baixa concentração de nutrientes. Por outro lado, este efeito não foi significativo em meio rico em nutrientes, indicando a competição por nutriente com principal modo de ação das leveduras.

A competição por espaço e nutrientes foi a modalidade de ação de *S. cerevisiae* apontada por CHEAH & HUNT (1994) como responsável pela redução na incidência de *B. cinerea* em kiwi em pós-colheita.

De acordo com FILONOW (1998) *S. cerevisiae* e outras duas leveduras, *C. lauretii* e *Sporobolomyces roseus* competiram por açúcares, absorvendo-os em maior quantidade e mais rapidamente do que *B. cinerea*. As leveduras misturadas com os conídios do patógeno em soluções estéril, com frutose, glicose ou sacarose diluídas, ou em suco de maçã diluído inibiram o germinação conidial em relação ao controle sem levedura, sendo que sob circunstâncias da fonte nutriente muito baixa ou de populações muito elevadas do antagonista a germinação dos conídios foi completamente suprimida. Na opinião do autor a competição desempenhou um papel central no antagonismo.

O efeito antagônico de *Pichia membranifaciens* sobre *B. cinerea* foi atribuído a capacidade da levedura de secretar β -1,3-glucanases (MASIH & PAUL, 2002), com relação a ação de *S. cerevisiae*, no entanto, esta modalidade de ação possivelmente não tenha ocorrido, pois FIALHO (2004), avaliando o modo de ação da levedura, não detectou a presença das enzimas líticas quitinase e glucanase em sua cultura.

Apesar das evidências do efeito de *S. cerevisiae* sobre *B. cinerea* por competição, os melhores resultados, no presente trabalho, foram obtidos com filtrado de cultura líquida e AM, preparações de *S. cerevisiae* sem a presença de células vivas da levedura (Tabela 13), indicando que a antibiose é um dos modos de ação envolvidos.

Em seu trabalho com leveduras antagonísticas entre elas *S. cerevisiae*, FILONOW (1998) observou que estas tiveram um consumo mais intenso de açúcar do que o patógeno *B. cinerea* inibindo o patógenos *in vitro* e em maçã feridas artificialmente. Entretanto, nenhuma diferença no consumo do açúcar foi observada entre leveduras com e sem a

atividade de biocontrole, sugerindo a existência de mecanismos adicionais no processo de ação antagônica.

Assim, possivelmente algum metabólito ou complexo de metabólitos produzidos por *S. cerevisiae* pode ter atuado diretamente sobre o patógeno ou sobre um fator de patogenicidade. FILONOW (1999) demonstrou que o efeito antagonístico de *S. cerevisiae*, *Cryptococcus laurentii* e *Sporobolomyce roseus* sobre *B. cinerea*, inibindo a germinação de conídios, está relacionado a capacidade destas leveduras de inibir o efeito estimulatório da germinação e o crescimento do fungo por compostos voláteis como os ésteres acetato (acetatos de etila, butila e hexila) produzidos por frutos como de maçã.

A ação de *S. cerevisiae* por indução de resistência a doenças no hospedeiro, *a priori*, não pode ser descartada, uma vez que, ADIKARAM et al. (2002) constataram a eficácia de *Aureobasidium pullulans* aplicada em frutos verdes de morango contra *B. cinerea*, tendo sido observado que fungo leveduriforme induziu resistência nos frutos, não havendo evidências de ação por antibiose *in vitro*. Contudo esta possibilidade não tem respaldo nos dados obtidos, pois o tratamento com a levedura autoclavada, que não apresentou efeito contra *B. cinerea* foi capaz de induzir resistência através da produção de PR-proteínas em folhas de morangueiro e esta capacidade não foi observada no tratamento com filtrado de meio de cultura eficiente contra o patógeno (Tabelas 11 e 12).

4.4 CONCLUSÕES

Os tratamentos com as preparações de *Saccharomyces cerevisiae* não interferiram nos parâmetros firmeza de polpa e acidez, no entanto, pode-se constatar uma menor taxa respiratória em frutos tratados com levedura comercial, uma menor produção de etileno e um maior teor de sólidos solúveis totais em frutos tratados com levedura comercial, filtrado de cultura líquida e Agro-MOS®.

Com exceção do tratamento com suspensão autoclavada de células, as preparações de *S. cerevisiae*: suspensão de células, suspensão com produto comercial, filtrado de cultura líquida e Agro-MOS®, reduziram a incidência de mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* em pós-colheita de frutos.

4.5 REFERÊNCIAS

ADIKARAM, N. K. B.; JOYCE, D. C.; TERRY, L. A. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action of *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v.31, n.3, p.223-229, 2002.

BATTA, Y. A. Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v.43, n. 1, p.143-150, 2007.

BLANCO, C.; SANTOS, B.; ROMERO, F. Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.114, n.4, p. 415-425, 2006.

BOFF, P.; KRAKER, J.; GERLAGH, M.; KOHL, J. Importância das pétalas no desenvolvimento do mofo-cinza do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.1, p.76-83, 2003.

BRACKMANN, A.; HUNSCHE M.; BALEM T. A. Efeito de filmes de PVC esticável e polietileno no acúmulo de CO₂ e na manutenção da qualidade pós-colheita de morangos cv. Tangi. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.5, n.2, p.89-92, 1999.

BRACKMANN, A.; HUNSCHE, M.; WACLAWOVSKI, A. J.; DONAZZOLO, J. Armazenamento de morangos cv. Oso Grande (*Fragaria ananassa* L.) sob elevadas pressões parciais de CO₂. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.1, p.10-14, 2001.

CHEAH, L. H.; MARSHALL, A. P. Biological control of Fusarium storage rot of squash with yeasts. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 48., 1995, Hastings. **Anais**. Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1995. p.337-339.

CHEAH, L. H.; TRAN, T. B. Postharvest biocontrol of Penicillium rot of lemons with industrial yeasts. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 48., 1995, Hastings. **Anais**. Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1995. p.155-157.

CHEAH, L.H.; HUNT, A.W. Screening of industrial yeasts for biocontrol of *Botrytis* storage rot in kiwifruit. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 47., 1994, Waitangi. **Anais**. Rotorua: New Zealand Plant Protection Society, 1994. p.362-363.

CIA, P. 2005. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. Piracicaba, 2005. 197p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p.314-319, 2004.

ELMER, P. A. G.; REGLINSKI, T. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. **Plant Pathology**, London, v.55, n.2, p.155–177, 2006.

EMBRAPA. **Mapa de reconhecimento de solos do Paraná**. Curitiba, 1984. 1 mapa: color.; 66 x 80 cm. Escala 1:1.000.000.

FIALHO, M. B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. Piracicaba, 2004. 60p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeasts in biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v.8, n.2, p.243-256, 1998.

FILONOW, A. B. Yeasts reduce the stimulatory effect of acetate esters from apple on the Germination of *Botrytis cinerea* conidia. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.25, n.7, p.1555-1565, 1999.

HELBIG, J. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. **BioControl**, Dordrecht, v.47, n.1, p.85-99, 2002.

HELBIG, J. Biological Control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in Strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, n.5, p.265-273, 2001.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: Atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de Gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Piracicaba, 2002. 118p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LEVY, R. M.; SILVA, R. S. S. F.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. Ensaio fatorial da atividade inibitória de *Penicillium* spp. por leveduras em frutos de maçãs. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v.3, p.145-150, 2000.

LI, G. Q.; HUANG, H. C.; KOKKO, E. G.; ACHARYA, S. N. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, n.43, n.3, 211-218, 2002.

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v.10, n.2, p.169-178, 1997.

LOPES, E. A. G. L. **Controle biológico de *Botrytis cinerea* in vitro e em mudas de *Eucalyptus* sp.** Lavras. 2001. 45p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras.

MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of β -1,3-Glucanases by the Yeast *Pichia membranifaciens* and Its Possible Role in the Biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing Grey Mold Disease of the Grapevine. **Current Microbiology**, New York, v. 44, n.4, p.391-395, 2002.

PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. Biocontrol of Mold Growth in High-Moisture Wheat Stored under Airtight Conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.3, p.1027-1032, 1995.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.21, n.9, p.400-407, 2003.

REGLINSKI, T.; LYON, G. D.; NEWTON A. C. The control of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce using elicitors extracted from yeast cell walls. **Journal Of Plant Diseases And Protection**, Stuttgart, v.102, n.3, p.257-266, 1995.

SANSONE, G.; REZZA, I.; CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; SANZ DE TOSETTI, M.I. "Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts" **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.35, n.3, p.245-251, 2005.

SCHMID, A.; DANIEL, C.; WEIBEL, F. Effect of cultural methods on leaf spot (*Mycosphaerella fragariae*) and gray mold (*Botrytis cinerea*) damage in strawberries. **BioControl**, Dordrecht, v.50, n.1, p.179-194, 2005.

SILVA, S. R. **Aspecto do controle da antracnose em plantas de milho (*Zea mays* L.), mantidas em casa-de-vegetação, pelo emprego de *Saccharomyces cerevisiae***. Piracicaba: 1989. 81p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

TIAN, S.; WAN, Y.; QIN, G.; XU, Y. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.70, p.729-734, 2006.

WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.127, n.3, p.213-222, 1995.

WSZELAKI, A. L.; MITCHAM, E. J. Effect of combinations of hot water dips, biological control and controlled atmospheres for control of gray mold on harvested strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v.27, n.3, p.255-264, 2003.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.1, p.138-143, 1998.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho forneceu resultados que permitem não rejeitar a hipótese de que *Saccharomyces cerevisiae* protege plantas de morangueiro contra doenças, confirmando que a levedura é um potencial agente de biocontrole, devendo ser conduzidos outros estudos, inclusive em associação com outras alternativas, no controle de doenças no morangueiro.

Para trabalhos futuros visando avaliar a proteção de *S. cerevisiae* em plantas de morangueiro contra doenças recomenda-se:

- Realizar o experimento em condições de cultivo favoráveis aos patógenos;
- Utilizar na avaliação uma cultivar suscetível às principais doenças;
- Fracionar e avaliar o efeito dos componentes presentes na cultura líquida sobre *Botrytis cinerea*;
- Avaliar o efeito das diversas formas da levedura sobre os fitopatógenos *in vitro*;
- Avaliar *in vitro* o efeito de extratos vegetais e outros produtos usados no controle alternativo fitopatógenos sobre levedura;
- Avaliar o possível aumento no efeito antagônico da levedura pela adição de diferentes substâncias ao meio de cultivo, tais como, quitina, glucana, fungos, e fitopatógenos do morangueiro inativados.

Anexo I Resultado da análise química do solo da área do experimento para avaliação de *Saccharomyces cerevisiae* para controle e indução de resistência a doenças em morangueiro, Dois Vizinhos-PR, Brasil, 2004.

